

СЕКЦИЯ «БИОИНЖЕНЕРИЯ И БИОИНФОРМАТИКА»**ПОДСЕКЦИЯ «БИОИНЖЕНЕРИЯ»****Концепции конструирования наноматериалов и наносистем из ДНК молекул****Белеля Олеся Петровна***студентка**Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина**E-mail: lela_platina@ukr.net*

Конструирование многофункциональных наноматериалов и наносистем (упорядоченные, периодически повторяющиеся наноструктуры, сборки) из отдельных и сборок ДНК молекул, как показал проведенный анализ, может основываться на следующих фундаментальных свойствах ДНК: структурных (двойная спираль Б-формы ДНК, и одинарная спираль, длины которых регулируются количеством нуклеотидов, комплементарность нуклеотидных цепей); химических (свободные связи одинарной спирали, изменяемые чередованием основ, и фосфорные группы на поверхности двойных спиралей, способные взаимодействовать с биотином и стрептавидином) и физических (увеличивающиеся фотоактивность и проводимость в сборках).

Свойство комплементарности нуклеотидных цепей, при особом подборе последовательностей нуклеотидов, можно использовать для сборки из пяти нитей нуклеотидов кристаллов ДНК, т.н. «черепиц», как предсказывается в результате компьютерных оценок (1). Наличие свободных связей у одинарной спирали, на т.н. «липких» концах, и особый выбор чередования основ на «липких» концах для каждого требуемого контакта позволяют собрать с помощью связывания «липкими» концами «черепиц» разного типа (содержащих разный набор оснований в «липких» концах) упорядоченные, периодически повторяющиеся наноструктуры, сети «черепиц» (1). Из двойных спиралей ДНК можно собрать ДНК нанотрубки в ассамблеи типа «черепица», благодаря приданию лоскуту из «черепиц» соответствующей симметрии и моделированию «черепицы» таким образом, что её геометрия придаёт ненулевую кривизну лоскуту из «черепиц» (2).

Для построения многофункциональных биочипов на собранных ДНК-материалах необходимо теоретические предсказания их электронных, фотоэлектронных (3) и механических (2) характеристик в зависимости от структуры этих материалов. Экспериментальные исследования проводились для «само - собранных» ДНК-наносистем — адсорбированных слоев из ДНК водных суспензий на различных поверхностях (например, на кремнии) — которые показали, что оптические характеристики (спектры поглощения в ультрафиолетовом и инфракрасном диапазонах длин волн) и фотолюминисценции в 290÷700 нм диапазоне определяются нано-, микроморфологией этих слоёв, т.е. структурой само - сборки.

Результаты получены под руководством канд. биологических наук Кисиль Е. А. (kysill@univ.kiev.ua, Tel/ Fax +38 044 526 10 73) и проф., докт. физ. – мат. наук Бузаневой Е. В. (evb@univ.kiev.ua, Buzaneva@aol.com).

Литература:

- 1 N.C. Seeman. DNA Nanotechnology // Materials today, 6(1), p. 24-29 (2003).
- 2 Paul W. K. Rothmund, Axel Ekani-Nkodo, Nick Paradakis, Ashish Kumar, Deborah Kuchnir Fygenon, and Erik Winfree Design and characterization of Programmable DNA Nanotubes // J A C S, vol. 126, N 50, 2004, 16344-16352
- 3 E. Buzaneva, A. Gorchinskiy, P. Scharff, K. Risch, A. Nassiopoulou, C. Tsamis,
- 4 Yu. Prilutskyy, O. Ivanyuta, A. Zhugayevych, D. Kolomiyets, A. Veligura, I. Lysko,

- 5 O. Vysokolyan, O. Lysko, D. Zherebetsky, A. Khomenko, I. Sporysh DNA, DNA/Metal nanoparticles, DNA/ Nanocarbon and macrocyclic metal complex/fullerene molecular building blocks for nanosystems: electronics and sensing // in book, E. Buzaneva and
6 P. Scharff (eds.), *Frontiers of Multifunctional Integrated Nanosystems*, Kluwer Academic Publishers, 2004, p.251-276

Влияние алкоголизации крыс на активность 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса мозга.

Климук Е.И. 1, Буник В.И1, Ловатъ М. 2, Ашмарин И.П. 2*

1Факультет Биоинженерии и Биоинформатики и 2Кафедра физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

**Студент 3-го курса Факультета Биоинженерии и Биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова,*

E-mail: jonikl@gmail.com

Этанол является наиболее используемым психоактивным агентом, но его действие на мозговые функции на молекулярном уровне изучено недостаточно. На поздних стадиях хронического алкоголизма развивается синдром Вернике-Корсакова. Как и при других нейродегенеративных патологиях, у таких пациентов понижена активность ключевой системы цикла трикарбоновых кислот в митохондриях, 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (ОГДК). Эти данные явились предпосылкой исследования возможности моделирования ОГДК-зависимой нейродегенерации на лабораторных животных. Целью настоящей работы было определить, меняется ли ОГДК в мозге при алкоголизации и последующем лечении крыс. Крыс алкоголизировали по методике свободного выбора, после чего одну из алкоголизированных групп лечили. Активность ОГДК определяли в полных гомогенатах мозга, хранившегося при -80°C . Замораживание мозга по-разному влияет на активность ОГДК в исследуемых группах животных, поэтому их сравнение по удельной активности ОГДК возможно лишь в свежезамороженных мозгах. Более устойчивым критерием изменения ОГДК является зависимость его удельной активности от концентрации белка в среде измерения. Такая зависимость наблюдается вследствие обратимой диссоциации-ассоциации компонентов полиферментных комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот. Мы показали, что алкоголизация крыс приводит к усилению этой зависимости, что свидетельствует о менее прочных взаимодействиях между компонентами ОГДК алкоголизированных крыс. Кроме того, известна регуляция ОГДК путем активации в полной реакционной среде. Такая активация была замедлена у алкоголизированных крыс, указывая на изменение регуляторных свойств комплекса. Исследованные зависимости сохраняются при замораживании мозга в течение времени, необходимого для всех измерений. Обнаруженные эффекты алкоголизации уменьшаются при лечении крыс. Таким образом, ОГДК мозга может быть индикатором метаболических изменений при алкоголизации и последующем лечении. Полученные результаты позволяют использовать моделирование алкоголизма на лабораторных животных для дальнейшего исследования механизмов ОГДК-зависимой нейродегенерации и возможных путей лечения таких патологий.

**Исследование структуры и параметров адсорбции митохондриальной
креатинкиназы на фосфолипидных мембранах в норме
и при окислительном стрессе ткани сердца.**

Неведомская Екатерина Владимировна, Пустовидко Антонина Викторовна, Высоких Михаил Юрьевич.

Студент 4 курса, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, научный сотрудник

Факультет Биоинженерии и Биоинформатики, Научно-Исследовательский Институт Физико-Химической биологии им. А.Н.Белозерского при Московском Государственном Университете им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

katnev@yandex.ru, antonina.pustovidko@gmail.com, mike@genebee.msu.su

Высокая ферментативная активность и определенная структура одинаково важны для выполнения креатинкиназой митохондрий функции поддержки уровня свободной энергии в клетке за счет обратимой реакции фосфорилирования креатина [1]. Олигомеризация митохондриальной креатинкиназы (мтКК) и сохранение ферментом в состоянии октамера способности к связыванию с мембранами митохондрий критичны для ингибирования неспецифической транзитной поры. Появление у внутренней мембраны митохондрий неспецифической проницаемости в условиях окислительного и нитрозильного стресса приводит к индукции апоптотического каскада, гибели клетки и падению функционального состояния сердечной мышцы, характерному для различных патологий [2]. Известно, что мембран-связывающие свойства мтКК существенно зависят от соотношения димер/октамер для белка и степени окисленности для липидов, в том числе, от наличия продуктов перекисного окисления кардиолипина [3]. Методами жидкостной хроматографии высокого разрешения, изоэнзимэлектрофореза, электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия и спектрофотометрии было показано, что индукция комплекса переходного состояния фермента в условиях окислительного стресса приводит к необратимому сдвигу соотношения олигомеров в сторону димера опосредованному повреждением аминокислот, ответственных за стабилизацию октамера мтКК. Однако, оказалось что использование антиоксидантов, адресованных в митохондрии посредством пришивания к замещенным хинонам липофильного катиона (трифенилфосфония) [4], обладает защитным действием в отношении фермента, обеспечивая высокое соотношение октамер/димер для мтКК. Методом тонкослойной хроматографии высокого разрешения [5] было показано, что защитное действие внутриклеточных антиоксидантов направленного действия обусловлено предотвращением образования гидроксильного радикала ОН. Дальнейшие исследования показали, что на молекулярном уровне защитное действие обусловлено предотвращением образования Шиффова основания (измеренного в соответствии с [6]) между вторичным продуктом перекисного окисления липидов малоновым диальдегидом и лизинами N-концевого участка полипептидной цепи мтКК, ответственного за связывание фермента с мембранами митохондрий. Полученные данные позволяют начать изучение молекулярных основ иницирующих стадий процесса клеточной гибели при окислительном стрессе, различных патологиях и при старении.

Литература

- 1 Crompton, M. (1999) *Biochem. J.* **341**, 233–249.
- 2 O’Gorman, E., Beutner, G., Dolder, M., Koretsky, A. P., Brdiczka, D.,
- 3 Wallimann, T. (1997) *FEBS Lett.* **414**, 253–257.
- 4 Dolder M, Wendt S, Wallimann T. (2001) *Biol Signals Recept.* **10**(1-2):93-111. Review.
- 5 Kelso GF, Porteous CM, Hughes G, Ledgerwood EC, Gane AM, Smith RA, Murphy MP. (2002) *Ann N Y Acad Sci.* **959**:263-74.
- 6 Schlame M., Rustow B. (1990) *Biochem. J.* (1990) **272**, 589-595.
- 7 Borovyagin VL, Muronov AF, Romyantseva VD, Tarachovsky YS, Vasilenko IA. *J Ultrastruct Res.* (1984) **89**(3):261-73.

Изучение физико-химических свойств мутантов красного флуоресцентного белка mRFP1.

Цой О., Вржещ Е. П.

студентка, аспирант Института биохимической физики РАН

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия .

E-mail: olgatsoj@list.ru

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия .

Изучение свойств флуоресцентных белков GFP-семейства (Green Fluorescent Protein) и разработка методов их применения позволяют решать многие задачи в биомедицине. Они являются превосходными маркерами генной экспрессии, локализации белков и позволяют визуализировать внутриклеточные процессы [1]. Помимо этого, именно на их основе созданы уникальные индикаторы локального внутриклеточного pH [2], для усовершенствования которых необходимо изучение физико-химических свойств белков.

К настоящему времени палитра цветов излучения флуоресцентных белков включает в себя оттенки во всем видимом световом диапазоне, но наибольший интерес представляют красные, вследствие лучшей проницаемости клеточных структур для красного света и снижения уровня шума, связанного с фоновой автофлуоресценцией тканей, лежащей преимущественно в желто-зеленой области спектра. Одним из наиболее перспективных красных флуоресцентных белков является мономерный красный флуоресцентный белок mRFP1 [3].

Целью данной работы является исследование физико-химических свойств белков-мутантов красного флуоресцентного белка mRFP1, а именно зависимостей интенсивности флуоресценции от pH для изучения влияния аминокислотных замен на изменение pH-чувствительности белка.

Получены следующие результаты:

- Изучено влияние pH на интенсивность флуоресценции мутантов mRFP1 (22ss, 4i, A5 и A8).
- Получены основные параметры, характеризующие pH-зависимости интенсивности флуоресценции мутантов mRFP1 (pK и коэффициент Хилла)
- Обнаружено, что интенсивность флуоресценция белков-мутантов взаимосвязана с тем, какой аминокислотный остаток расположен в 66 позиции белковой цепи.
- Обнаружено, что инактивация флуоресценции в кислой области происходит при протонировании одной ионогенной группы белка.

Библиография.

- Inouye S., Tsuji F. Aequorea green fluorescent protein: expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein // FEBS Lett., 1994, v. 341, pp. 277-280.
- Llopis J., McCaffery J. M., Miyawaki A., Farguhar M. G., Tsien R. Y., Measurement of cytosolic, mitochondrial and Golgi pH in single living cells with green fluorescent protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, v. 95, pp. 6803-6808.
- Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY A monomeric red fluorescent protein // Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jun 11;99(12):7877-82

Биокаталитическое получение индивидуальных энантиомеров аминокислот при использовании пенициллинацилазы**Кудрявцев П.А., Ушаков Г.А., Панин Н.В., Бибин А.В., Гуранда Д.Т., Швядас В.К.**

Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова,

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ

kudryavtsev@belozersky.msu.ru

Разделение энантиомеров природных и неприродных аминокислот проводили интегральным биокаталитическим методом [1], основанном на двух стереоселективных реакциях, катализируемых пенициллинацилазой в водной среде – исчерпывающего ацилирования активного (S)-энантиомера из рацемата аминокислотного соединения и, после отделения продукта от оставшейся незатронутой (R)-аминокислоты, гидролиза образованного на первой стадии N-ацильного производного с получением (S)-аминокислоты. Детальные кинетические исследования позволили выявить закономерности стереоселективного ацильного переноса на аминокислоты, катализируемого пенициллинацилазой в водной среде, и определить кинетические параметры биокаталитических превращений. В частности, каталитические константы составляют сотни обратных секунд, а значения стереоселективности выше 1000. На основании экспериментально определенных кинетических параметров реакций ацильного переноса и гидролиза N-ацильных производных, катализируемых пенициллинацилазой, и разработанной математической модели интегральной кинетики таких реакций, проведен анализ влияния различных факторов на эффективность синтеза N-ацильных производных и разделения энантиомеров аминокислотных соединений в водной среде в рамках предложенной схемы. Выявлены оптимальные условия стадий стереоселективного синтеза и последующего гидролиза N-ацильного производного, что позволило проводить расщепление энантиомеров с высокой эффективностью – расщепление высококонцентрированного раствора (1 М) рацемата аминокислоты удается провести за несколько часов. Индивидуальные энантиомеры аминокислот были выделены с высоким выходом и оптической чистотой более 98%.

Активность и стабильность бактериальных пенициллинацилаз**Суплатов Д.А., Сидорова А.В., Гуранда Д.Т., Щербакова Т.А., Янг Ш., Швядас В.К.**

а Факультет биоинженерии и биоинформатики, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

б Институт физиологии растений и экологии, Шанхайские институты биологических наук Китайской академии наук, 200032 Шанхай, КНР

genesup@belozersky.msu.ru

Исследована активность и стабильность пенициллинацилаз (ПА) из грамотрицательных *Escherichia coli* и *Alcaligenes faecalis* и грамположительной бактерии *Bacillus megaterium* в широком интервале pH и температуры. Ферменты этого семейства чрезвычайно стабильны и проявляют высокую каталитическую активность при физиологических значениях pH (7-8), однако необратимо теряют активность в кислых и щелочных средах, а также при температурах выше 60°C. Эксперименты по реактивации *in vivo* показали, что необратимая термо- и pH-инактивация этих Ntn-гидролаз не обусловлена деградацией их первичной структуры. Инактивированный как в “жестких” (при экстремальных значениях pH и температуры) так и в “мягких” (pH 7, 25°C в мочевины) условиях фермент может быть реактивирован более чем на 50%, причем значения каталитических параметров в обоих случаях соответствуют таковым для нативного препарата. Анализ pH-зависимости эффективной константы инактивации рассмотренных пенициллинацилаз указывает на ключевую роль ионных пар для поддержания их стабильной конформации. Разрушение солевых мостиков в результате протонирования или депротонирования аминокислотных остатков, образующих ионные пары, обуславливает инактивацию

цию за счет образования нестабильных “кислотных” (EH_3^{2+} , EH_2^+) и “щелочных” (E^- , E^{2-}) форм фермента. Отличительной особенностью ферментов из *Alcaligenes faecalis* и *Bacillus megaterium* является их высокая активность и стабильность в щелочной среде. На основании данных рентгеноструктурного анализа пенициллинацилаз из *Escherichia coli* и *Providencia rettgeri* были сконструированы трехмерные структуры для ферментов *Alcaligenes faecalis* и *Bacillus megaterium*. Анализ третичных структур различных пенициллинацилаз свидетельствует о том, что образование солевых мостиков внутри глобулы белка имеет решающее значение для стабильности ферментов. При этом предполагается, что важную роль играют ионные пары, образованные боковыми радикалами наиболее основных остатков (гуанидиновыми остатками аргинина) и наиболее кислотных остатков (карбоксильными группами аспарагиновой кислоты).

Ключевые слова: пенициллинацилаза, pH-стабильность, температурная стабильность

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант 03-04-39012).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИСТЕИН-БОГАТОГО БЕЛКА АЛЛЕКСИВИРУСА С ЗАЩИТНОЙ СИСТЕМОЙ РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА

Игнатович Игорь Владимирович, Луховицкая Нинна Иосифовна, Соловьев Андрей Геннадьевич

Студент третьего курса.

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия.

E-mail: chivik@gmail.com

Исследование молекулярных механизмов взаимодействия вируса с растением-хозяином, как на клеточном уровне, так и на уровне целого растения, является центральным направлением современной фитовирусологии. Одним из важных аспектов вирусного патогенеза является взаимодействие и коэволюция систем антивирусной защиты растения и вирусных систем, позволяющих обходить или подавлять их. Одной из защитных систем растения является посттранскрипционное умолкание генов (ПТУГ) - механизм регуляции экспрессии генов, оснований на специфичном узнавании и деградации РНК. Подтверждением антивирусной роли ПТУГ служит то, что растения способны преодолевать вирусную инфекцию и после этого становятся устойчивыми к заражению тем же или родственными вирусами, а также существованием вирусных белков-супрессоров ПТУГ.

Нитевидный X-вирус лука шалота (ShVX – ХВЛШ) принадлежит к роду *Allexivirus* семейства *Flexiviridae* (Kanyuka et al., 1992). Геном ХВЛШ состоит из одной молекулы РНК положительной полярности имеющей кэп структуру на 5'-конце и поли(А) на 3'-конце. Геномная РНК аллексивирусов содержит 6 ОРТ. ОРТ 6 кодирует цистеин-богатый белок (ЦББ) (Kanyuka et al., 1992; Arshava et al., 1995; Song et al., 1998).

Функция ЦББ ХВЛШ неизвестна. Для изучения роли ЦББ ХВЛШ был сконструирован рекомбинантный геном X-вируса картофеля (ХВК), несущий ген ЦББ ХВЛШ. Экспрессия ЦББ ХВЛШ в составе генома ХВК резко изменяла характер симптомов, вызываемых ХВК при инфекции *N. benthamiana*. Вместо бессимптомной инфекции и слабой мозаики, свойственных ХВК в этом растении-хозяине, рекомбинантный вирус, экспрессирующий ЦББ ХВЛШ, вызывал образование локальных некрозов на инокулированных листьях и некротизацию апикальной части растения. В экспериментах по временной экспрессии ЦББ ХВЛШ с помощью агроинфильтрации было показано, что этот белок не является фактором авирулентности в *N. benthamiana* и не способен супрессировать посттранскрипционное умолкание генов. Сходными свойствами обладает продукт трансляции ОРТ6 вируса табачной мозаики (ВТМ, Tobamovirus) (Canto et al., 2004), белок 8К вируса скрученности верхушек картофеля (ВСКВ, pomovirus) (Lukhovitskaya et al., 2005) и белок 12К В-вируса хризантемы (ВВХ, carlavirus) (Lukhovitskaya et al.,

2005а). На основании этого сходства можно объединить эти белки в новый класс вирусных белков, определяющих ответ растения-хозяина на вирусную инфекцию, но при этом не влияющих на ПТУГ и не являющихся факторами авирулентности.

Литература

- 1 Arshava, N. V., Konareva, T. N., Riabov, E. V., and Zavriev, S. K. (1995). 42K protein of shallot X virus is expressed in infected *Allium* species plants. *Molekuliarnaia Biologiia* 29, 192-198 [in russian].
- 2 Canto Tomas, Stuart A. MacFarlane and Peter Palukaitis (2004) ORF6 of Tobacco mosaic virus is a determinant of viral pathogenicity in *Nicotiana benthamiana* *Journal of General Virology* 85, 3123–3133.
- 3 Kanyuka, K. V., Vishnichenko, V. K., Levay, K. E., Kondrikov, D. Yu., Ryabov, E. V. and Zavriev, S. K. (1992) Nucleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 5'-proximal cistron closely related to those of potexviruses and a unique arrangement of the 3'-proximal cistrons *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 10), 2553-2560
- 4 Lukhovitskaya N. I., N. E. Yelina, A. A. Zamyatnin Jr, M. V. Schepetilnikov, A. G. Solovyev, M. Sandgren, S. Yu. Morozov, J. P. T. Valkonen and E. I. Savenkov, (2005) Expression, localization and effects on virulence of the cysteine-rich 8 kDa protein of Potato mop-top virus *Journal of General Virology* 86, 2879–2889.
- 5 Lukhovitskaya N. I., A. G. Solovyev, T. E. Koshkina, S. K. Zavriev, S. Yu. Morozov, (2005) Interaction of the Carlavirus Cysteine-Rich Protein with the Plant Defense System *Molecular Biology, Vol. 39, No. 5, pp. 785–791.*
- 6 Song, S. I., Song, J. T., Kim, C. H., Lee, J. S., and Choi, Y. D. (1998). Molecular characterization of the garlic virus X genome. *J. Gen. Virol.* 79, 155-159.

Исследование структуры и свойств и разработка методов работы со специфической формой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из сперматозоидов человека

Юрьева Марина Валерьевна; Щуцкая Юлия Юрьевна; Шмальгаузен Елена Викторовна; Муронец Владимир Израилевич

студент; студент; научный сотрудник, к. б. н.; профессор, д. б. н.

Факультет биоинженерии и биоинформатики и биологический факультет, НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: yurjeva@mail.ru, ylkamail@gmail.com, shmal@belozersky.msu.ru, vimuronets@mail.ru

В последние несколько десятилетий во всем мире отмечается снижение фертильности мужчин и ухудшение качества спермы. В этиологии бесплодия человека мужской фактор занимает 30-60%. При этом около 30% (согласно различным источникам, от 30 до 50%) всех случаев мужского бесплодия относят к так называемому идиопатическому, т.е. необъяснимому или неясному бесплодию.

Известно, что глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), катализирующая одну из стадий гликолиза, имеет специфическую структуру в сперматозоидах человека. Этот фермент отвечает за прогрессивную подвижность сперматозоидов, и регуляция его активности, по-видимому, может влиять на их фертильность. Исследования в этой области представляют большой научный и практический интерес с точки зрения изобретения новых контрацептивных препаратов и лечения бесплодия.

В последовательности специфической формы ГАФД из сперматозоидов (ГАФД-С) есть полипролиновый участок, которого нет в ГАФД из соматических клеток, и нет участка, отвечающего за вывод ГАФД из ядра (Nuclear Export Signal, NES), присутствующего в ГАФД из всех тканей человека. Ранее было показано биоинформатическими методами, что в ГАФД-С этого участка нет. Белок ГАФД из соматических тканей по мнению некоторых авторов не присутствует в сперматозоидах.

Целью данной работы стала разработка методики по очистке и выявлению ГАФД-С в сперматозоидах человека, а также проверка наличия NES в ГАФД-С.

При помощи иммуноблоттинга с моноклональными антителами, специфичными к последовательности NES, нами было установлено, что в ГАФД-С отсутствует сигнал ядерного экспорта. Таким образом, были подтверждены биоинформатические данные.

Помимо этого нами было показано, что ГАФД из соматических клеток может присутствовать в сперматозоидах, вопреки представленным в литературе данным.

Была отработана методика по очистке и выявлению ГАФД-С в сперматозоидах человека. Вследствие того, что ГАФД-С закрепляется на нерастворимых структурных элементах клетки, обычные методы экстракции фермента разрушением клеток не являются достаточно эффективными. Поэтому мы использовали инкубацию осадка с протеолитическим ферментом трипсином, отделяющим ГАФД-С от структурных элементов.

Литература

- 1 Брагина Е. Е., Абдумаликов Р. А. (2002) Руководство по сперматологии / БФТ-Декора, с. 9-22
- 2 Brown, V. M. et al. (2004) A novel CRM1-mediated nuclear export signal governs nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase following genotoxic stress / J. Biol. Chem., 279, p. 5984-5992
- 3 Welch J. E., Brown P. L., O'Brien D. A., Magyar P. L., Bunch D. O., Mori C., Eddy E. M. (2000) Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells / J. Andrology, 21 (2), p. 328-338

Влияние углеводсвязывающего участка лектинов на формирование специфичности бобово-ризобиального симбиоза

Губайдуллин Ирек Ильясович

научный сотрудник

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

E-mail: irekgi@rambler.ru

Характерным признаком всех лектинов является их углеводспецифичность на которой основаны их разнообразные функции. Знания о закономерностях формирования специфичности лектинов могут быть использованы в моделировании белков с новыми и заданными углеводсвязывающими свойствами, что может найти применение в биотехнологии и фармакологии. Кроме того, создание данных модифицированных или гибридных лектинов возможно будет способствовать исследованию их роли в становлении бобово-ризобиального симбиоза, поскольку в настоящее время сведения о полноразмерных генах лектинов бобовых растений умеренного климата весьма ограничены. Эксперименты с растениями трансгенными по лектинам позволяют оценить роль этих белков, однако такие исследования довольно сложны. Поэтому параллельно ведутся исследования симбиотической роли лектинов путем экзогенной обработкой ими растений и микроорганизмов. Кроме того, довольно сложно выделить лектины в чистом виде из растительного экстракта в котором имеются активаторы и ингибиторы ризобиальных *nod*-генов, принимающих участие в развитии симбиоза.

Основываясь на имеющиеся данные о ключевых аминокислотах углеводсвязывающей последовательности (УСП) и других структурно-функциональных особенностях лектинов [1-2], нами созданы гибридные конструкции на основе полноразмерного гена лектина гороха PSL с замещенным УСП лектина *Astragalus glycyphyllos* (*psl/agl*). Анализ углеводсвязывающих свойств показал, что модификация специфичного к маннозе/глюкозе лектина PSL, привела к приобретению у него аффинности к галактозе и заметному ослаблению сродства к маннозе. Таким образом, разработанный нами подход позволяет моделировать лектины с разнообразной специфичностью. Для исследования физиологической роли лектина PSL/AGL в развитии симбиоза нами была проведена экзогенная обработка

данном белком проростков люцерны *Medicago sativa* и гетерогенных клубеньковых бактерий астрагала. В результате инокуляции были обнаружены серые инфицированные клубеньки. Таким образом, мы наблюдали совершенно нетипичные отношения между люцерной и бактериями астрагала. Это свидетельствует о том, что УСП лектина, являющегося, таким образом, одним из критических факторов специфичности данной симбиотической системы, имеет большое значение как в формировании инфекционных нитей так и инфицированных ризобиями клубеньков. Данные результаты имеют большое значение в решении такого вопроса бобово-ризобияльного симбиоза как специфичность взаимоотношений симбионтов. Так, можно интродуцировать гены таких гибридных лектинов в бобовые растения с целью увеличить группу их клубеньковых бактерий, из которых растения в данных почвенно-климатических условиях могут выбрать наилучшего партнера для симбиоза, что, в конечном счете, может привести к более высокому уровню азотфиксации, а, стало быть, и к росту урожайности сельскохозяйственных культур.

Литература

- 1 Streicher H., Sharon N. Recombinant plant lectins and their mutants // *Method Enzymol.* 2003. V. 363. P. 47-77.
- 2 Manoj N., Suguna K. Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins // *Protein Eng.* 2001. V. 14. P. 735-745.

Влияние протимозина альфа на экспрессию p53-зависимых генов

Захарова Наталья Ильинична

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: zakharova_n.i@mail.ru

Ядерный белок протимозин альфа обладает свойствами онкобелка, стимулирует пролиферацию, участвует в защите клеток от апоптоза и окислительного стресса. Предполагается, что протимозин альфа регулирует экспрессию ряда генов. Мы решили исследовать возможное влияние протимозина альфа на функционирование опухолевого супрессора p53.

Для этого была сконструирована репортёрная плазмида, кодирующая ген люциферазы светлячков под контролем p53-зависимого промотора. Экспрессия репортёрного гена усиливалась при увеличении концентрации p53 в клетке и уменьшалась при эктопической экспрессии его ингибитора Hdm2.

Показано, что при суперэкспрессии протимозина альфа в клетках HeLa возрастает как внутриклеточная концентрация p53, так и уровень экспрессии p53-зависимого репортёрного гена. Следовательно, протимозин альфа действительно влияет на функционирование опухолевого супрессора p53.

Идентификация стартового кодона гена субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*

Каюмов А.Р., Байрамов Р.А., Шарипова М.Р.

аспирант

Казанский государственный университет, Казань, (Россия)

E-mail: airat_kayumov@rambler.ru

Бактерии *Bacillus intermedius* секретируют в среду различные протеиназы, среди которых доминирует субтилизиноподобная сериновая протеиназа, кодируемая геном *aprVi*. На ее долю приходится более 80% от пула внеклеточных протеиназ этих бактерий. Ген протеиназы клонирован на плазмиде pCS9 и установлена последовательность нуклеотидов в регуляторной и кодирующей области. В 6,06-kb вставке участка хромосомы *B.intermedius* 3-19 с помощью программы ORF Finder была идентифицирована от-

крытая рамка считывания, которая кодирует белок, по структуре и свойствам сходный с сериновыми протеиназами. Проведенный анализ последовательности с помощью программы ORF Finder позволил выявить 3 потенциальных сайта инициации синтеза белка.

Для установления сайта инициации трансляции был использован алгоритм SignalP, основанный на статистическом анализе последовательности, следующей после предполагаемого иницирующего кодона. Эта последовательность должна с максимальной вероятностью функционировать как сигнальный пептид. Результаты анализа показали, что с максимальной вероятностью (95-97%) функционально активному сигнальному пептиду будут соответствовать последовательности, синтез которых начинается с TTG или GTG кодонов.

С целью идентификации стартового кодона были сконструированы мутантные гены субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*, в которых произведена замена нуклеотидов в одном или нескольких из предполагаемых сайтов инициации трансляции. Были получены плазмиды рКА, рКТ, рКГ и рКТГ, в которых имеются мутации соответственно в следующих сайтах: ATG, TTG, GTG, TTG и GTG. При внесении мутации производилась замена двух последних нуклеотидов в триplete, из-за чего в составе предполагаемой сигнальной последовательности менялась одна аминокислота в случаях кодонов ATG и GTG. Чтобы минимизировать риск получения ложноотрицательного результата вследствие этого, замены производились таким образом, чтобы аминокислота заменялась на подобную по свойствам. Полученными плазмидами был трансформирован лабораторный штамм AJ73, дефицитный по генам внеклеточных протеиназ. В качестве контроля была использована плазида рCS9.

Полученные теоретические данные хорошо согласуются с результатами эксперимента. Мутация в сайте ATG не привела к каким либо изменениям в уровне экспрессии гена, при замене нуклеотидов в сайтах GTG и TTG экспрессия гена она отсутствует. Этот факт позволяет сделать заключение, что кодон ATG не является иницирующим в гене *aprBi*, и синтез белка начинается с TTG или GTG. Изменение сайта TTG привело к снижению уровня экспрессии гена *aprBi* в 3-4 раза по сравнению с контролем, тогда как мутация триplete GTG делает невозможной экспрессию гена.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что синтез субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* начинается с GTG кодона. Снижение уровня синтеза белка при измененной последовательности TTG, скорее всего, связано с нарушениями в конформации сайта связывания с рибосомой вследствие образования шпильки на матричной РНК.

Исследование метаболизма и гепатотоксичности производного фторхинолона FCh-4 in vitro

А.В. Дейкин, В.И. Туробов

Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (филиал) РАН, лаборатория биологических испытаний, г. Пуццо

deikin@rambler.ru,

факс (0967) 33 05 27, телефон (0967) 73 37 53

Принципам биоэтики требуют использовать модели in vitro, которые позволяют если не заменить, то уменьшить количество экспериментальных животных в биомедицинских исследованиях.

Выделение гепатоцитов проводили методом двустадийной перфузии печени. Праймированных соволом самцов крыс Sprague-Dawley весом 200-300 г подвергали эктаназии, быстро вскрывали и вводили канюлю в нижнюю полую вену. Перфузию печени осуществляли первоначально раствором Хэнкса без Ca⁺⁺/ Mg⁺⁺ в течении 5 мин при скорости 10 мл/мин, а затем раствором Хэнкса, содержащем коллагеназу (25 ед/мл) и 6.7 мМ Ca⁺⁺, 10 мин, 5 мл/мин. Печень гомогенизировали прессом через сито, пропускали через двойной капроновый фильтр. Полученные клетки дважды отмывали раствором

Хэнкса 70g по 5 мин (выход составил 10×10^6 клеток/г печени) и наносили на двуступенчатый градиент фикол/гразограф с плотностью 1,074 и 1,13 г/л. Часть гепатоцитов использовали для получения микросомальной фракции, часть замораживали для хранения в жидком азоте.

Получение микросомальной фракции. Гепатоциты разрушали в гомогенизаторе стекло/тефлон в холодном 10 mM HEPES pH 7.4/0.25 M сахараза буфере, содержащем ингибиторы протеаз. Затем проводили дифференциальное центрифугирование: отделяли S9 фракцию центрифугированием 11 000g, 45 мин, JA-20; микросомальную фракцию получали ультрацентрифугированием 105 000 g, 60 мин, L5-75.

Тестирование на метаболическую стабильность. Тестирование проводили в 96-луночной планшете. Инкубационная смесь при определении метаболической стабильности вещества содержала в 100 мкл NADPH-генерирующую систему (0.5 mM NADP, 5 mM G6P, 2 ед. G6PDH/мл, and 5 mM $MgCl_2$), 7.5 мкМ FCh-4 или 5 мкМ диклофенака как внутреннего контроля, и микросомальную суспензию (8 мг белка в 1.0 мл 0.1 M фосфатного буфера). В определенное время 0,3,6,9, 2,15,18,24,30,40 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл холодного ацетонитрила. Контроли на инкубацию не содержали NADP и вещества. Методом совмещенной LC/MS установлено количество оставшихся через 40 мин инкубации веществ, которое составило для диклофенака 51% и для FCh-4 27%.

Тестирование на гепатотоксичность. Размороженные гепатоциты высаживали в 96-луночные культуральные планшеты, покрытые коллагеном $12,5 \text{ мкг/см}^2$, плотность 2×10^4 кл/лунку в 100 мкл полной среды DMEM/F12 с добавками, инкубировали при 37C, 5% CO₂. Спустя 4 часа в лунки добавляли разведения 10^{-4} - 10^{-9} исследуемого вещества FCh-4 и контрольного вещества винкристина, в качестве отрицательного контроля использовали растворитель - ДМСО. Через 20 часов инкубации добавляли по 10 мкл раствора МТТ 5 мг/мл и выдерживали в инкубаторе еще 4 часа. Супернатант отбирали, кристаллы формазана растворяли в ДМСО, оптическую плотность измеряли спектрофотометрически при длине волны 550 нм. IC₅₀ для FCh-4 был определен по кривой доза/жизнеспособность клеток и составил $1,2 \times 10^{-5}$ M.

Таким образом, полученные данные по метаболической стабильности и гепатотоксичности FCh-4 позволяют рассчитать скорость выведения и токсичность вещества *in vivo*, необходимые для определения терапевтической дозы, что позволит существенно снизить количество используемых в эксперименте животных.

Включение лактатдегидрогеназы в полиэлектролитные микрокапсулы.

Тихоненко С.А., Дубровский А.В., Сабурова Е.А., Шабарчина Л.И., Дыбовская Ю.Н., Сухоруков Б.И.

аспирант

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142292 г.Пуцино, Моск. обл.

e-mail: tsa83@rambler.ru

Работа посвящена разработке методологии создания загруженных ферментом полиэлектролитных нано и микрокапсул, способных найти применение в биотехнологии, медицине и в промышленности. В 1999 году нами предложен способ включения ферментов в полиэлектролитную микрочастицу путем поочередного наслаивания противоположно заряженных полиэлектролитов. Далее был предложен способ включения ферментов в полую полиэлектролитную капсулу. В последнее время разрабатывается способ инкапсулирования ферментов путем послойной адсорбции полиэлектролитов на составной микросферолит фермент-СаСО₃. Все эти способы направлены на решение следующих задач: 1) сохранение ферментативной активности после полиэлектролитной иммобилизации; 2) повышение термостабильности фермента и его устойчивости к аг-

рессивным средам; 3) малый расход фермента (в капсуле доли пикограмма); 4) многократное использование микрокапсул. Основными вопросами при решении этих задач являются: 1) подбор из большого числа полиэлектролитов противоположно заряженной пары, не снижающей активность фермента; 2) нахождение условий среды – pH, ионной силы, количества полиэлектролитных слоев. Для ответа на эти вопросы использованы экспериментальные и теоретические методы и продемонстрированы на примере лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Нами произведен расчет распределения электростатического потенциала на поверхности ЛДГ, из которого следует, что поликатионы не способны взаимодействовать с ферментом, а, следовательно, его инактивировать, в то время как полианионы могут сильно взаимодействовать: наличие протяженных участков с положительным потенциалом вблизи гидрофобной области субъединичных контактов создают условия для конкурентного связывания полианионов с гидрофобным остовом и последующего разрушения фермента. Результаты расчета подтверждаются экспериментальными данными, полученными с использованием флуоресцентной спектроскопии, кругового дихроизма, калориметрии и стационарной ферментативной кинетики. Показано, что кинетические параметры и термостабильность инкапсулированного фермента существенно зависят от способа включения его в капсулу, а также от природы полиэлектролитов и числа слоев в капсуле.

Изучение свойств новой эндонуклеазы рестрикции *BisI* из *Bacillus subtilis* T30

Севастьянова Оксана Олеговна

Студентка 5 курса

Новосибирский государственный университет, Факультет Естественных Наук, Новосибирск, Россия

E-mail: sevastyanova@gorodok.net

Ферменты, расщепляющие специфические последовательности ДНК являются одними из ключевых инструментов молекулярной биологии и геномной инженерии. Поэтому обнаружение новых эндонуклеаз рестрикции, изучение свойств этих ферментов, а также разработка методик получения очищенных препаратов и методов их применения остаются актуальной задачей.

В связи с возросшим в последние годы интересом к влиянию эпигенетических модификаций на такие процессы, как канцерогенез, инактивация X-хромосомы, геномный импринтинг, клеточная дифференцировка, регуляция процессов рекомбинации и защита генома от инвазии и распространения чужеродной информации, актуально разрабатывать новые методы изучения характера метилирования эукариотического генома. Кроме того, сайт специфические рестриктазы могут являться необходимыми инструментами в клинической диагностике и терапии таких заболеваний, как Синдромы Прадера-Вилли и Энгельмана.

Экспериментальное определение статуса метилирования ДНК млекопитающих с помощью сайт специфических эндонуклеаз, основано на сопоставлении рестрикционных фрагментов, образующихся после обработки ДНК эндонуклеазами, которые узнают одинаковые сайты, содержащие цитозин, но гидролизуют их по-разному, в зависимости от того, находится ли это основание в метилированном состоянии или нет.

Цель моей работы - исследовать свойства эндонуклеазы рестрикции *BisI*, выделенной из штамма *B. subtilis* T30, узнающей и расщепляющей нуклеотидную последовательность 5'-G(m5C)NGC-3'.

Задачами моей работы являлось сравнение эффективности гидролиза ферментом *BisI* сайта узнавания с разным количеством и расположением C5-метилированных цитозиновых оснований. В ходе выполнения работы было определено место гидролиза ДНК внутри сайта узнавания – после первого модифицированного цитозина, а также показано, что фермент не расщепляет не модифицированный субстрат. Определена активность

фермента. На основании экспериментальных данных сделали вывод, что в сайтах узнавания с симметричным метилированием обе цепи гидролизуются с одинаковой скоростью.

Выявлена закономерность, что наиболее эффективно расщепляется узнаваемая последовательность нуклеотидов, в которой метилированы два внутренних цитозиновых основания, или два внутренних и одно внешнее. Значительно хуже расщепляются сайты узнавания с исчерпывающим метилированием, а также в случае только одного модифицированного цитозина. Полуметилированный сайт, содержащий две метильные группы на одной цепи, гидролизуются с достаточно высокой эффективностью.

Таким образом, в отличие от других рестриктаз, эндонуклеаза рестрикции *BisI* помимо нуклеотидной последовательности узнавания и места расщепления ДНК характеризуется третьим параметром: количеством и расположением C5-метилированных цитозиновых оснований в сайте узнавания.

Научный руководитель: д-р биол. наук, проф. С.Х. Дегтярев

Принципы биомолекулярной инженерии углеродных супрамолекулярных флуидов

Кисиль Елена Александровна

ассистент кафедры медицинской радиофизики, кандидат биологических наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,

Радиофизический факультет, Киев, Украина

E-mail: lklk@univ.kiev.ua

Выявленная биоактивность углеродных супрамолекул – фуллеренов, нанотрубок – открывает возможность применения биоинженерии для конструирования бионаноуглеродных флуидов [1, 2]. Сфера потенциального использования в медицине и биологических исследованиях углеродных наносистем в биомолекулярном окружении – бионаноуглеродных флуидов – включает различные направления, такие как обнаружение нуклеиновых кислот и белков, доставку генов и лекарственных соединений, клиническую диагностику и мониторинг чужеродных микроорганизмов.

Идея конструирования бионаноуглеродных флуидов основана на следующих принципах. В качестве носителя биомолекул выбраны укороченные многостенные углеродные нанотрубки, обладающие интенсивной фотолюминисценцией в видимом диапазоне, благодаря их геометрической, химической и электронной структурам [2]. Для суспендирования нанотрубок в водных растворах применяются сурфактанты либо проводится ковалентная иммобилизация поверхностных атомов углерода, например – при окислении. Метод для суспендирования подбирается исходя из общего заряда биомолекул при pH 7,0, которые вносятся в среду для создания нанофлуида. Поэтапное конструирование приводит к самоорганизации наносистемы из биомолекул и нанотрубок. Управление организацией наносистемы достигается применением вспомогательных молекул. Например, для адсорбции отрицательно заряженных молекул нуклеиновых кислот на поверхности углеродных нанотрубок, также имеющих поверхностные отрицательно заряженные карбоксильные группы вследствие окисления, применяется положительно заряженный полиэлектролит – полимер. Возможна также фотостимулированная организация наносистем в результате обмена зарядами на интерфейсе нанотрубка – биомолекула согласно предложенной модели [2].

Основываясь на перечисленных принципах, сконструированы бионанофлуиды из многостенных углеродных нанотрубок, молекул аденозин мононуклеотида и дезоксирибонуклеиновой кислоты. Для приготовления водных суспензий были использован сурфактант (*sodium dodecyl sulfate*) или окисление поверхностных и концевых атомов углерода нанотрубок путем обработки азотной кислотой. Сравнительный анализ полученных бионанофлуидов проведен методами абсорбционной спектроскопии в ультрафиолетовом, видимом и инфракрасном диапазонах, а также фотолюминесцентной спектроско-

пии в 300-700 нм диапазоне. На основании полученных экспериментальных результатов предложены структурные модели бионаноуглеродных флуидов.

Автор благодарит проф. П. Шарффа и его коллег из химической лаборатории (Технический Университет Ильменау, Германия) за изготовление углеродных нанотрубок, а также за помощь при проведении измерений и обсуждении результатов. Планирование и обсуждение эксперимента проведено совместно с проф., д.б.н. Войцицким В.М.; проф., д.ф.-м.н. Бузаневой Е.В.

1. E. Buzaneva, A. Gorchinskiy, P. Scharff et al. DNA, DNA/metal nanoparticles, DNA/nanocarbon and macrocyclic metal complex/fullerene molecular building blocks for nanosystems: electronics and sensing//Frontiers of multifunctional integrated nanosystems, NATO Science Series II, Math., Physics and Chemistry – NATO, vol 152, 2004, p. 251-276.

2. Kysil O. Design and Photoluminescence Investigation of Multi-walled Carbon Nanotubes Noncovalent Functionalised by Mono- and Polynucleotides // The Sc. Works of The 6th International Young Scientists Conference "Optics and High Technology Material Science SPO 2005". - Kyiv (Ukraine). - 2005. - P. 40.

Изучение взаимодействий между цитоплазматическими окончаниями

Долгов Михаил Сергеевич, Зерний Евгений Юрьевич

студент, кандидат химических наук

Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; НИИФХБ им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

dolgov@belozersky.msu.ru zerni@mail.ru

Рецепторы, сопряженные с G-белками, представляют собой наиболее обширное семейство трансмембранных рецепторов, принимающих участие в регуляции целого ряда самых разнообразных процессов в живой клетке. На сегодняшний день установлено, что нарушение функционирования таких рецепторов у человека является причиной широкого спектра различных заболеваний. В частности показано, что мутации в гене одного из представителей семейства рецепторов, сопряженных с G-белками – зрительного пигмента родопсина – вызывают нарушения функционирования зрительной системы, которые приводят к частичной или полной слепоте. Одной из таких мутаций родопсина является замена Arg135Leu. Поэтому цель настоящей работы – выявление структурных и функциональных отличий родопсина дикого типа и его мутантной формы Arg135Leu.

В рамках настоящей работы проведен анализ литературных данных, касающихся структурных и функциональных свойств родопсина, изучена структура ближайшего окружения Arg135 в молекуле родопсина, выявлены внутримолекулярные взаимодействия, в которых принимает участие Arg135, а также проведено сравнение способности родопсина дикого типа и его мутанта Arg135Leu активировать G-белок трансдуцин и фосфорилироваться родопсинкиназой светозависимым образом. В частности, установлено, что а) Arg135 локализован на границе α -спирали H3 и второй цитоплазматической петли, и может образовывать контакты с Glu134 (α -спираль H3), Glu247 (α -спираль H6) и Thr251 (α -спираль H6); б) Arg135 образует ионные взаимодействия с Glu134 и Glu247, а также водородные связи с Glu134, Glu247 и Thr247, которые принимают участие в стабилизации темновой структуры рецептора, удерживая вместе цитоплазматические окончания α -спиралей H3 и H6; в) в мутантной форме родопсина Arg135Leu происходит нарушение взаимодействий между аминокислотными остатками в положениях 134, 135, 247 и 251, что приводит к взаимному отталкиванию α -спиралей H3 и H6, и возникновению частично активированной конформации родопсина, которая фосфорилируется родопсинкиназой светонезависимым образом; г) мутант родопсина Arg135Leu ни в темноте, ни на свету не способен активировать трансдуцин, что говорит о непосредственном участии Arg135 во взаимодействии между этими белками.

Влияние трансфекции антисенс-ДНК на экспрессию танкиразы в культуре клеток эмбриональной почки человека линии 293**Хуторненко А.А., Черняева А.С.**

студентки

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель – к.б.н. Куимов А.Н.

Танкираза – фермент, являющийся одним из компонентов белкового нуклеопротеидного комплекса и участвующий наряду с другими белками в поддержании структуры теломер, изучение особенностей строения и функционирования которых может пролить свет на пока еще малоизученные механизмы регуляции старения и процессы опухолевой трансформации клеток многоклеточного организма [1]. В данной работе мы изучали экспрессию изофермента танкиразы-2 в культуре клеток почки человека линии 293. Ферментативная активность танкиразы-2 в клетках, трансфицированных ДНК, которая кодирует антисенс-РНК для танкиразы-2, уменьшается по сравнению с клетками, трансфицированными контрольной плазмидой с геном зеленого флуоресцентного белка. Эффективность трансфекции в обоих случаях составила около 10%. Результаты экспериментов позволяют утверждать, что подавление экспрессии белка негативно влияет на ферментативную активность танкиразы-2.

1 А.Н. Куимов. БЕЛКОВЫЕ КОМПОНЕНТЫ ТЕЛОМЕРНОГО НУКЛЕОПРОТЕИДНОГО КОМПЛЕКСА. *БИОХИМИЯ*, 2004, том 69, вып. 2, с. 149 – 163.

Разработка модификации метода SELEX, основанной на использовании целлюлозосвязывающих доменов**Ершова Анна Степановна, Кузнецова Анастасия Юрьевна,
Мостовенко Екатерина Викторовна**

аспирант, студент, студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: a_ershova@rambler.ru

Регуляция экспрессии генов осуществляется при взаимодействии специфических белков – транскрипционных факторов с регуляторными последовательностями ДНК. Важной проблемой при изучении механизмов регуляции экспрессии является нахождение регуляторных последовательностей для различных факторов транскрипции.

Одним из способов решения данной проблемы является метод *in vitro* селекции или SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment).

Целью данной работы была разработка новой модификации метода SELEX, основанной на иммобилизации исследуемого белка в составе химерной генно-инженерной конструкции на целлюлозном сорбенте за счет нековалентного взаимодействия целлюлозы и целлюлозосвязывающего домена, входящего в состав конструкции. Это позволило упростить процесс выделения целевых продуктов в процессе селекции, и избежать использования радиоактивной метки.

В качестве модельного объекта для отработки новой модификации метода SELEX был выбран гомеодомен *Antennapedia*. Была создана химерная конструкция, содержащая гомеодомен *Antennapedia*, спейсер и целлюлозосвязывающий домен из *Anaerocellum thermophilum*. Полученный химерный белок был иммобилизован на целлюлозе, и использован в SELEX.

Эксперимент по SELEX включал следующие этапы: 1) синтез вырожденной библиотеки, 2) отбор специфических фрагментов, 3) ПЦР с полученными в результате отбора фрагментами.

Для сравнения эксперимент повторяли с белком, не способным связывать ДНК (целлюлозосвязывающий домен из *Anaerocellum thermophilum*), и с целлюлозой без иммобилизованного белка.

Отбор специфических фрагментов производился следующим образом. Вырожденную библиотеку в буфере для связывания (10 мМ Трис-НСl, рН=8,0; 50 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА; 1 мМ ДТТ; 5% глицерина; 10 мкг БСА; 1% NP-40; 15 мкг polyGC) вносили в пробирку, содержащую иммобилизованный на целлюлозе исследуемый белок, выдерживали 1 час на столе. Несвязавшиеся и неспецифически связавшиеся фрагменты 10 раз отмывали 20-кратным избытком высокосолевого буфера (10 мМ Трис-НСl, рН 8,0; 200 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА; 1 мМ ДТТ; 5 % глицерина; 10 мкг БСА; 1 % NP-40). Специфически связавшиеся фрагменты элюировали при нагревании до 98°C.

Для выделения последовательностей с наибольшим сродством к исследуемому белку цикл «отбор – ПЦР» был повторен 5 раз. Затем полученные фрагменты были клонированы и секвенированы. Наличие специфического связывания белка с ДНК контролировали, измеряя количество ДНК в элюенте, полученном при нагревании.

Сравнение данных полученных при измерении количества ДНК показало, что количество ДНК, отбирающейся в эксперименте с гомеодоменом больше 40 нг, тогда как количество ДНК, отбирающейся в экспериментах с целлюлозой или целлюлозосвязывающим доменом, не превышает 5 нг.

Анализ отобранных последовательностей показал, что во многих из них присутствует мотив ТАА, характерный для известных сайтов связывания белка Antrp.

Таким образом, нами показана принципиальная возможность использования предложенной модификации метода SELEX для отбора последовательностей связывания белка.

Поиск новых промоторов каулимовирусов и конструирование их химерных форм

Кулуев Булат Разянович

аспирант

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

E-mail: kuluev@bk.ru

При создании трансгенных растений весьма важным является выбор промотора для обеспечения достаточного уровня экспрессии чужеродного гена, если не требуется другое. В настоящее время одним из наиболее широко используемых служит сильный конститутивный 35S промотор, выделенный из вируса мозаики цветной капусты из группы каулимовирусов (Odell et al., 1985). При этом есть бинарные векторы для трансформации растений, в которых и селективный и маркерный (или целевой) гены находятся под контролем все того же 35S промотора, что может отрицательно сказываться на уровне экспрессии и иногда приводит к "молчанию" трансгена. В этой связи представляет значительный интерес как обнаружение новых еще более сильных промоторов, так и создание химерных. И поскольку 35S промотор Cauliflower Mosaic Virus оказался во многом универсальным, то стали осуществляться поиски аналогичных геномных промоторов других каулимовирусов. Таким образом, были выделены и исследованы промоторы вирусов мозаики норичника, ночной красавицы, земляники, кассавы. Последний, например, оказался даже более сильным, чем 35S промотор (Samac et al., 2004). Однако допустить мысль о том, что самые лучшие промоторы для целей создания трансгенных растений уже найдены или сконструированы было бы неправильным. Исходя из этого, мы приступили к поиску различных каулимовирусов с целью амплификации, клонирования и секвенирования их геномных промоторов с последующими получением соответствующих генно-инженерных конструкций и проведением ДНК-шаффлинга для создания химерных форм. Так, был амплифицирован участок генома вируса георгина Dahlia Mosaic Virus, содержащий каулимовирусный геномный промотор, теоретически занимающий не более 500 пн, но ввиду того, что этот каулимовирус секвенирован лишь частично, то

прямой и обратный праймеры удалось подобрать к известным последовательностям, довольно далеко отстоящим от границ промотора. В результате в фагмидном векторе рKRX нами клонирован участок генома данного вируса размером 1290 пн и начато его секвенирование. Из зараженных вирусом Carnation Etched Ring Virus листьев гвоздики, присланных из Германии, были амплифицированы участки ДНК размером 501 и 651 пн, включающие геномный промотор этого вируса. Оба фрагмента ДНК, отличающиеся лишь расположением праймеров, были клонированы в фагмидных векторах рKRX и рBluescript II KS (-). Их секвенирование показало 95%-ную гомологию с промоторным участком изолята вируса CERV из США и 96%-ную гомологию с индийским изолятом того же вируса. Несмотря на то, что геном вируса CERV полностью секвенирован, его промотор детально не исследован и для получения трансгенных растений, насколько нам известно, еще не применялся. На основе клонированных фрагментов нами готовятся генно-инженерные конструкции с маркерными генами *gfp* и *gus* под контролем промоторов CERV и DMV для оценки их "силы" в трансгенных растениях. Параллельно нами ведется подготовка к "семейному" ДНК-шаффлингу всех имеющихся у нас геномных промоторов каулимовирусов CaMV, CERV и DMV.

Литература

- 1 Odell J.T., Nagy F., Chua N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the CaMV promoter // Nature. 1985. V.313. P. 810-812.
- 2 Samac D.A., Tesfaye M., Dornbusch M., Saruul P., Temple S.J. A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*) // Transgenic Res. 2004. V.13. P.349-361.

Клонирование промотора и кодирующей области гена фитохелатинсинтазы риса *Oryza sativa*

Постригань Богдан Нилович

аспирант

Институт биохимии и генетики Уфимского Научного Центра РАН, Уфа, Россия

E-mail: postrigan@bk.ru

С развитием промышленности растет загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами, в число которых входят ртуть, кадмий, свинец, цинк, медь и некоторые другие. Поэтому проблеме устойчивости растений к тяжелым металлам уже на протяжении многих лет во всем мире уделяется значительное внимание. Тяжелые металлы являются опасными экотоксикантами, тормозящими, с одной стороны, рост самих растений, а с другой при попадании в пищевые цепи оказывающими вредное воздействие на человеческий организм. Одним из наиболее опасных для человека тяжелых металлов (принимая во внимание, как саму токсичность металла, так и его встречаемость в почвах) является кадмий. Значительная часть кадмия попадает на поля вместе с вносимыми фосфорными удобрениями, приводя, таким образом, к постоянному увеличению этого высокотоксичного металла в сельскохозяйственных угодьях. Известно, что появление в клетках растений и некоторых дрожжей металлотионеинов класса III, называемых еще фитохелатинами, напрямую связано с присутствием в среде тяжелых металлов. По-видимому, у подавляющего большинства растений основную нагрузку по связыванию и "обезвреживанию" ряда тяжелых металлов выполняют именно фитохелатины (Cobbett, 2000; Clemens, 2006).

Целью нашего исследования является изучение молекулярных механизмов функционирования гена фитохелатинсинтазы путем создания серии трансгенных растений табака в качестве модельного объекта. Часть таких трансгенных растений должны нести маркерный ген *gfp* под контролем промотора фитохелатинсинтазы риса, что позволит опосредованно по уровню свечения зеленого флуоресцентного белка оценить вклад тяжелых металлов, включая кадмий, в индукцию синтеза фитохелатинов. Другая группа

трансгенных растений табака будет нести дополнительный ген фитохелатинсинтазы риса под контролем сильного конститутивного промотора 35S, что позволяет прогнозировать увеличенное количество фитохелатинов и пригодность таких растений для фиторемедиации. Анализ нуклеотидной последовательности генома риса (Yu et al., 2002) позволил нам подобрать праймеры для амплификации как предполагаемой промоторной области гена фитохелатинсинтазы, так и его кодирующей части протяженностью около 900 пн и 2400 пн соответственно. Секвенирование амплифицированных и клонированных в фагмидном векторе pGEM-T фрагментов ДНК риса подтвердило специфичность отжига праймеров. Для определения границ промотора фитохелатинсинтазы и изучения его работы в трансгенных растениях табака на основе бинарного вектора pCambia 1304 созданы генно-инженерные конструкции, в которых промотор 35S, управляющий в исходном векторе работой маркерного гена *gfp*, по сайтам рестрикции *HindIII/NcoI* с их достройкой с помощью ДНК полимеразы был заменен делеционными вариантами исследуемого промотора риса.

Литература

- 1 Cobbett C.S. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy metal detoxification // Current Opinion Plant Biology. 2000. V. 3. P. 211-216.
- 2 Clemens S. Evolution and function of phytochelatin synthases // J. Plant Physiol. 2006. V.163. P. 319-332.
- 3 Yu J., Hu S., Wang J. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) // Science. 2002. V.296. P. 79-92.

Гибридизационная цепная реакция (ГЦР) в реальном времени, основанная на эффекте флуоресцентного резонансного переноса энергии

Чемерис Дмитрий Алексеевич

младший научный сотрудник

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия,

E-mail: chemeris_da@anrb.ru

Не так давно предложенная (Dirks, Pierce, 2004) новая быстрая цепная реакция - гибридизационная успешно переведена нами в режим реального времени (Чемерис и др., 2006). Особенности ГЦР является то, что в ней не происходит амплификации детектируемых фрагментов ДНК или РНК, а имеет место самосборка наноконструкций, иницируемая искомыми последовательностями и свидетельствующая о присутствии таковых. ГЦР протекает изотермически без участия каких-либо ферментов и является по существу нанобиотехнологией. Движущей силой ГЦР является энергия, заключенная в двух особым образом сконструированных олигонуклеотидных шпильках, несущих верхушечную петлю, одноцепочечный участок и двуцепочечный стержень, причем последний с учетом антипараллельности цепей ДНК одинаков у обеих структур. Петля первой шпильки комплементарна выступающему одноцепочечному участку на 5'-конце второго олигонуклеотида, а петля второй шпильки комплементарна такому же участку, только расположенному на 3'-конце первой. В отсутствии инициаторной молекулы эти олигонуклеотидные конструкции стабильны и не вступают в реакцию гибридации. Однако стоит только появиться в реакционной смеси инициаторной (искомой) последовательности ДНК или РНК, как шпильки начинают поочередно раскрываться, и происходит пошаговый теоретически неограниченный рост цепей ДНК, детекция которого велась нами в ДНК-амплификаторе iCycler iQ (Bio-Rad, США) в ряде случаев по увеличивающейся за счет эффекта дегашения флуоресценции, что имело место при разнесении в пространстве пары молекул флуорохром/гаситель, изначально сближенных в составе одной из олигонуклеотидных шпилек. Электрофорез подтвердил линейный рост наноконструкций и отсутствие такового в образцах без инициатора, в том числе в присутствии неспецифических ДНК или РНК.

Однако нам показалось, что более перспективным будет проведение ГЦР, основанной на эффекте флуоресцентного резонансного переноса энергии от красителя-донора, входящего в состав одной из шпилек, к красителю-акцептору, входящему в состав другой шпилечной структуры. Расположение флуорохромов было подобрано таким образом, что в ходе ГЦР при формировании олигонуклеотидных конструкций они располагались на расстоянии, где происходил эффективный перенос энергии, регистрируемый как свечение красителя-акцептора после возбуждения красителя-донора, причем изменение флуоресценции характеризовалось стандартной кривой, быстро выходящей на плато. Несмотря на то, что ГЦР пока уступает ПЦР (полимеразная цепная реакция) и ЛЦР (лигазная цепная реакция) по чувствительности, нам представляется, что у нее есть хорошие предпосылки даже в нынешнем неразветвленном варианте по этому показателю их превзойти.

Литература

- 1 Dirks R.M., Pierce N.A. Triggered amplification by hybridization chain reaction // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 15275-15278.
- 2 Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Матниязов, Р.Т., Гималов Ф.Р., Романенкова М.Л., Вахитов В.А. ПЦР, ЛЦР и ГЦР - цепные реакции нуклеиновых кислот в режиме реального времени // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2006. Т.1, №2. С.3-9.

Математическая модель самоподдерживающейся высокозамкнутой по массообмену экспериментальной экосистемы (без учета человека)

Бабичева Елена Владимировна

аспирантка

Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия

E-mail:guban@ibp.ru

В настоящее время пристальное внимание мирового сообщества обращено к следующим задачам – освоению космоса (международная экспедиция на Марс, освоение Луны) и усилению влияния парникового эффекта. Длительные полеты и орбитальные станции требуют разработки биологических систем жизнеобеспечения (БСЖО) как с наличием человека на борту, так и при его отсутствии. Последнее замечание имеет то основание, что при выходе человека из системы, последняя должна оставаться самоподдерживающейся. Для оценки характера функционирования экспериментального модуля БСЖО **без учета человека** и возможности управления им построена математическая модель, опирающаяся на кинетические коэффициенты и зависимости, получаемые в экспериментальных исследованиях Института биофизики СО РАН.

Математическая модель состоит из двух компартментов – модели “фитотрона” и модели “почвоподобного субстрата”. В модель включены следующие компоненты: в качестве автотрофа (первичного продуцента) высшее растение рода *Arabidopsis*, мертвое органическое вещество в фитотроне (опад), калифорнийские черви, продукты жизнедеятельности червей (копролиты), вермикомпост, использующийся как почвоподобный субстрат (ППС), бактериальная микрофлора, минеральные формы биогенных элементов (азот, фосфор, железо), кислород и углекислый газ. В модели учтены следующие процессы: фотосинтез арабидопсиса в зависимости от освещенности (непрерывное и 12 час день – 12 час ночь) и количества биогенных элементов; дыхание червей, бактерий, ночное дыхание арабидопсиса; опад; утилизация червями и бактериями отмершей фитомассы; переработка бактериями копролитов червей в минеральную форму; постоянный водо- и газообмен между компартментами. Теоретически показано, что такая модельная система способна к существованию и обладает устойчивым стационарным режимом функционирования. Модель позволяет оценить значения всех учитываемых динамических компонентов экосистемы.

Человеческая деятельность стала столь интенсивной, что начала оказывать влияние на климатические условия в глобальном масштабе. Одним из проявлений этого влияния является усиление парникового эффекта (Парниковый эффект, изменение климата и экосистемы // Под.ред. Б.Болина и др. Л.: Гидрометеиздат, 1989, 570 с.). Сам экспериментальный модуль может использоваться и как модельный инструмент для исследования некоторых биосферных процессов, в этом случае важно установить степень подобия этих процессов. А математическая модель может быть использована для оценки тенденций развития соответствующих исследуемых процессов в экспериментальной системе с дальнейшей экстраполяцией их на подобные биосферные процессы. Например, с ее помощью может быть проведена оценка динамики CO_2 в зависимости от изменения температуры в атмосфере модуля, в предположении, что процессы производства (дыхание) CO_2 и его потребления (фотосинтез) имеют разные температурные оптимумы. Т.е. в этом случае может быть внесен определенный вклад в ответ на вопрос о действительной роли CO_2 в регуляции парникового эффекта и в оценке роли в этом феномене биотической составляющей биосферных процессов. Такой эксперимент может быть рассчитан на модели, а затем реализован в эксперименте с модулем, что и запланировано.

Применение термоэлектрических модулей Пельтье для охлаждения ячеек дифференциального сканирующего калориметра при решении задач оперативного контроля качества лекарственных препаратов

Колпаков И.М.

аспирант,

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино (Россия).

E-mail: imkolpakov@rambler.ru

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) являются в настоящее время одним из наиболее широко применяемых физических методов исследования свойств биологических объектов [1]. Производство приборов для таких исследований стало самостоятельной отраслью приборостроения. Серийно выпускаемые модели этих приборов являются универсальными, поэтому их параметры, как правило, избыточны для отдельных конкретных методик. В то же время методы сканирующей калориметрии могут быть эффективно использованы для решения актуальной прикладной задачи по оперативному контролю качества лекарственных препаратов [3]. Целесообразно оптимизировать параметры прибора под эту задачу, что позволит существенно снизить стоимость такого специализированного прибора.

Произведен поиск и инженерное исследование технических решений, обеспечивающих аппаратную реализацию микрокалориметров серии ДСМ применительно к задаче оперативного контроля качества лекарственных препаратов. Определены параметры температурных условий калориметрических измерений. Оказалось, что для контроля лекарственных препаратов достаточным является диапазон температур от 0°C до 300°C .

Такой диапазон можно обеспечить более простыми, чем традиционные методы охлаждения [2]. Оптимальным решением является применение системы охлаждения с термоэлектрическими модулями Пельтье. Была разработана такая система охлаждения измерительных ячеек ДСК микрокалориметра. Эффективным оказалось решение с отводом тепла от горячего спая за счет свободной конвекции охлаждающей жидкости.

В процессе разработки и испытания опытного образца системы охлаждения обеспечена реализация заложенных требований, наиболее оптимально адаптированных к задаче контроля качества лекарственных препаратов в требуемом для такого контроля температурном диапазоне и обеспечены высокие метрологические характеристики в составе сканирующего микрокалориметра типа ДСМ – 10.

Литература

- 1 Бойко Б.Н. Прикладная микрокалориметрия: отечественные приборы и методы. Изд-во «Наука». Москва, 2006.
- 2 Григорьев В.А., Крохин Ю.И. Тепло - и массообменные аппараты криогенной техники. М.: Энергоиздат, 1982. – 372 с.
- 3 Сливкин А.И., Селеменев В.Ф., Суховерхова Е.А. Физико-химические и биологические методы оценки качества лекарственных средств. Воронеж: изд. Воронежского гос. ун-та, 1999, 366 с.

Исследование динамики кровотока в стенозированных артериях

*Алексейчук Светлана Анатольевна, Иванов Дмитрий Валерьевич,
Петров Даниил Владимирович*

студентка 4 курса, студенты 5 курса

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

E-mail: ivanovdv@info.sgu.ru

Целью настоящей работы является оптимизация хирургического вмешательства на кровеносных сосудах человека. Сосудистая патология является главной причиной расстройств кровообращения и, как следствие, повышения смертности населения разных стран.

Одной из причин расстройств кровообращения является стеноз магистральных сосудов. По данным разных авторов экстракраниальные поражения в виде сужения и окклюзии сонных и позвоночных артерий составляют от 25 до 65% среди причин возникновения ишемического инсульта. Таким образом, существует настоятельная необходимость в определении степени риска естественного развития окклюзирующих поражений магистральных артерий человека, особенно в области бифуркации, и степени эффективности соответствующих хирургических вмешательств по восстановлению нормального кровотока.

Научная проблема заключается в выявлении основных свойств кровотока и напряженно-деформированного состояния стенок артерии.

Численные исследования проводились для двумерной и трехмерной модели с использованием конечно-элементных пакетов COMSOL MULTIPHYSICS 3.2 [5] (двумерный случай и трехмерный случай), ANSYS 7.0 (трехмерный случай). При исследовании делались следующие предположения: кровь представляет собой вязкую, ньютоновскую, однородную, несжимаемую жидкость, движение которой описывается системой уравнений Навье-Стокса [1]; материал стенок артерии – однородный, изотропный и идеально-упругий.

В результате численных экспериментов как для двумерного, так и для трехмерного случаев были получены линии тока движения крови, а также построены картины распределения напряжений на стенках артерий. Были выявлены вихревые зоны до и после сужения сосуда. Также наблюдался обратный ток крови в области сужения.

Проведенная работа помогает развитию более глубоких представлений о гемодинамике и механизмах взаимодействия кровотока с сосудистой стенкой.

Литература

- 1 Лойцянский Л.Г. (1970) Механика жидкости и газа. //М.: Наука.
- 2 Пурия Б.А., Касьянов В.А. (1980) Биомеханика крупных кровеносных сосудов человека // Р., «Зинате»
- 3 H. Liu, T. Yamaguchi (2001) Waveform Dependence of Pulsatile Flow in a Stenosed Channel // ASME J. Biomech. Eng., №123, p. 88-96.
- 4 Иванов Д.В. (2005) Численное исследование движения крови в верхней части аорты //Математика. Механика. Сб. науч. тр. – Саратов: Вып. 7, с.168-171.
- 5 www.comsol.com (Официальный сайт производителя COMSOL MULTIPHYSICS 3.2).

Исследование возможности инженерии реакций катализируемых пенициллинацилазой для синтеза и расщепления рацематов в водной среде

Сидорова А.В., Кудрявцев П.А., Ушаков Г.А., Гуранда Д.Т.

Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ

sidorova@belozersky.msu.ru

Исследовано влияние различных факторов на эффективность и стереоселективность синтеза и гидролиза широкого круга N-ацильных производных аминокислот, катализируемого пенициллинацилазой в водной среде. Ферменты этого семейства чрезвычайно стабильны и активны в нейтральной и слабощелочной средах. Детальное исследование субстратной специфичности пенициллинацилаз из различных бактериальных источников показало, что, несмотря на общность свойств, их каталитическая активность, субстратная специфичность и стереоселективность весьма различны. ПА из *A. faecalis* является наиболее эффективным катализатором в реакциях гидролиза/синтеза амидов и проявляет высокую стереоселективность по отношению к N-ацильным производным широкого круга аминокислот, включая нефункционализированные амины. ПА из грамположительных *B. megaterium* проявляет примерно одинаковую активность и умеренную стереоселективность по отношению к N-ацильным производным аминокислот, аминокислотам и аминам, что, по-видимому, связано с отсутствием в активном центре остатка R(145, консервативного в ряду пенициллинацилаз грамотрицательных бактерий. В целом, стереоселективность пенициллинацилаз слабо зависит от pH и снижается при предельных значениях pH, в условиях быстрой инактивации фермента. Понижение температуры реакционной среды приводит к монотонному увеличению стереоселективности и падению каталитической активности биокатализатора.

Отличительной особенностью ПА из *A. faecalis* и *B. megaterium* является их высокая стабильность и активность в щелочной среде (pH 10), что позволяет использовать их в качестве катализаторов ацильного переноса на высокоосновные аминокислоты. Установлено, что структура ацильной части и уходящей группы субстрата определяют в значительной мере эффективность и стереоселективность катализируемого пенициллинацилазой гидролиза и ацильного переноса. В отличие от ПА из *B. megaterium*, ферменты грамотрицательных *A. faecalis* и *E. coli* высоко активны по отношению к α -замещенным N-фенилацетидам, что, с одной стороны, дает возможность синтеза широкого круга полифункционализированных соединений, и, с другой стороны, позволяет регулировать кинетические параметры ферментативного превращения рациональным выбором ацильного донора.

Исследование термодинамических и кинетических параметров реакций синтеза/гидролиза N-фенилацильных производных аминокислот позволило выявить оптимальные условия для синтеза и расщепления энантиомеров. Сравнение методов биокаталитического получения оптически активных соединений в водной среде показало, что метод ацильного переноса имеет преимущества при ацилировании или расщеплении рацематов высокоосновных аминокислот. Метод прямой конденсации предпочтителен при ацилировании или разделении энантиомеров малоосновных гидрофобных аминов, в ходе которого образуется плохо растворимый продукт. Метод стереоселективного гидролиза наиболее предпочтителен при разделении энантиомеров малоосновных аминокислот, для которых N-ацильное производное характеризуется высокой растворимостью в водных растворах. Проведенные исследования легли в основу реакций синтеза полифункционализированных хиральных соединений и расщепления рацематов широкого круга аминокислот.

Ключевые слова: пенициллинацилаза, инженерия биокаталитических превращений, стереоселективность, оптически активные вещества.

Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (контракт 02.435.11.3005 “Ферменты в реакциях тонкого органического синтеза”).

Разрушение ДМФ в воде штаммом *Pseudomonas putida* MK55

Волкова К.В.

младший научный сотрудник

ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

[e-mail: ksenm@mail.ru](mailto:ksenm@mail.ru)

Диметиловый эфир орто-фталевой кислоты (ДМФ) широко применяется как пластификатор, растворитель, репеллент, а также используется при изготовлении косметики, смазочных материалов, тканей и пр. Вследствие несовершенства технологических процессов, а также из-за отсутствия прочных химических связей с полимерами, ДМФ может попадать в объекты окружающей среды. Наличие мутагенной и тератогенной активностей, способность накапливаться в живых организмах наряду с широким использованием его в промышленности является причиной пристального внимания к проблеме интенсификации процессов разрушения ДМФ.

Из почвы химического предприятия методом накопительных культур нами выделен микроорганизм-деструктор ДМФ, идентифицированный как *Pseudomonas putida*, штамм MK55. Кроме ДМФ в качестве единственного источника углерода и энергии он может использовать о-фталевою кислоту, метанол, бензоат и протокатехат, но не утилизирует метанол, катехол, 3-метилбензоат, салицилат, изо- и терефталевою кислоты.

Выявлена активность фталат-4,5-диоксигеназы и катехол-1,2-оксигеназы. Наличие этих ферментов свидетельствует о расщеплении о-фталаата через 4,5-диоксифталевою кислоту и карбокси-цис,цис-муконат. Показано, что расщепление ароматического кольца происходит в орто-положении.

Иммобилизация на носителях способствует удержанию бактерий-деструкторов в очистном сооружении. Закрепление микроорганизмов интенсифицирует процесс деструкции загрязняющего вещества, поскольку способствует созданию повышенных концентраций бактерий в малом объеме. Кроме того, иммобилизованные клетки лучше защищены от воздействия неблагоприятных факторов, менее чувствительны к токсичным субстратам и функционируют дольше свободноплавающих.

Установлено, что деструктивная активность клеток *Pseudomonas putida* MK55, иммобилизованных на лавсановом волокне, значительно выше, чем у свободноплавающих. Для разрушения 1% ДМФ в жидкой среде М9 свободноплавающими клетками требуется 72 часа, в то время как иммобилизация снижает время деструкции до 24 часов.

Содержание ДМФ в среде контролировали методом ЯМР-спектроскопии.

Проведенное исследование показало, что выделенная нами культура *Pseudomonas putida* MK55 способна чрезвычайно эффективно утилизировать диметилфталат –1% субстрата в жидкой минеральной среде полностью утилизируются иммобилизованными клетками уже за 24 часа, 2% – за 72 часа, 5% – за 264 часа, 10% разрушается за месяц на 60%.

Кроме того, выявлена высокая устойчивость *Ps. putida* MK55 к токсическому действию ДМФ – штамм способен выдерживать до 30% токсиканта в среде, хотя и не способен при этом его эффективно утилизировать. Следует отметить, что концентрации ДМФ, превышающие 2%, являются чрезвычайно высокими и могут наблюдаться в сточных водах предприятий лишь при аварийных выбросах.

Высокая деструктивная активность данного микроорганизма, а также значительная устойчивость к токсическому действию ДМФ предполагает возможность его использования в биотехнологиях локальной очистки сточных вод, содержащих ДМФ.

Утилизация метановоздушных выбросов с использованием метанотрофных бактерий**Казаков Дмитрий Александрович***студент**Пермский государственный технический университет, Пермь, Россия**E-mail: kazakovbiotech@mail.ru*

На сегодняшний день глобальный поток шахтного метана в атмосферу оценивается в 35 ± 10 млн. т/год, что составляет около 10 % от суммарной мощности антропогенных источников. Увеличение содержания метана в атмосфере способствует усилению парникового эффекта, так как метан интенсивно поглощает тепловое излучение Земли в инфракрасной области спектра на длине волны 7,66 мкм [1]. Метан не обладает высокой токсичностью, однако этот газ оказывает слабое наркотическое действие на человеческий организм (ПДК 300 мг/м^3). Метановоздушные смеси с концентрацией метана 5-15 % (об.) чрезвычайно взрывоопасны. В соответствии с требованиями безопасности в качестве топлива могут использоваться лишь смеси воздуха и метана с концентрацией последнего менее 2,5 % (об.) или более 30 % (об.). Однако при дегазации угольных пластов образуются значительные объёмы метановоздушных смесей, содержание метана в которых находится именно в интервале 2,5-30,0 % (об.), в связи с чем такие смеси считаются не кондиционными и выбрасываются в атмосферу. В этом отношении перспективным представляется применение биотехнологического процесса утилизации метановоздушных выбросов [3, 4], основанного на использовании метанотрофных бактерий, способных потреблять метан в качестве единственного источника углерода и энергии [2].

В ходе экспериментальных исследований проведено выделение смешанных и чистых культур метанотрофных бактерий. В результате скрининга выделенных метанотрофов выбрана культура, характеризующаяся максимальной удельной скоростью утилизации метана. Показано, что процесс бактериальной утилизации метана ускоряется при увеличении интенсивности перемешивания культуральной жидкости. Данный факт говорит о том, что процесс протекает в диффузионной области. Результаты исследования зависимости удельной скорости роста от концентрации метана в газовой фазе указывают на то, что скорость процесса утилизации лимитируется массопередачей метана из газовой фазы в жидкую. Таким образом, биоабсорбцию метана бактериальной суспензией можно приближённо описывать с помощью уравнений, используемых при расчёте процессов абсорбции газов жидкостью. На основе полученных результатов разработан проект биоабсорбера, позволяющего перерабатывать $3000 \text{ м}^3/\text{ч}$ метановоздушной смеси, снижая концентрацию метана с 15 % (об.) до 2,5 % (об.) и получая при этом 87 кг/ч биомассы метанотрофных бактерий. Также в ходе проектирования предложена технологическая схема установки для реализации процесса, позволяющая получать биомассу метанотрофных бактерий, которая может быть использована в качестве сырья для производства кормового белка, бактериальных препаратов, ферментов и азотсодержащих удобрений.

Литература

- 1 Бажин М.Н. Метан в атмосфере// Соросовский образовательный журнал. 2000. Т. 6. № 3. С. 52-57.
- 2 Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. М.: ГЕОС, 2001. - 500 с.
- 3 Sly L.I., Bryant L.J., Cox J.M., Anderson J.M. Development of a biofilter for the removal of methane from coal mine ventilation atmospheres// Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993. V. 39. P. 400-404.
- 4 Apel W.A., Dugan P.R., Wieve M.R. Use of methanotrophic bacteria in gas phase bioreactor to abate methane in coal mine atmospheres// Fuel. 1990. V. 70. № 8. P. 1001-1003.

Идентификация гена термостабильной РНКазы Н в фаговой клонотеке *Thermus flavus*

Постригань Богдан Нилович

аспирант

Институт биохимии и генетики Уфимского Научного Центра РАН, Уфа, Россия

E-mail: postrigan@bk.ru

Предложенная более 15 лет назад (Duck et al., 1990) технология циклирующей пробы (ТЦП), основанная на уникальном свойстве РНКазы Н разрушать гетеродуплексы РНК/ДНК, не затрагивая при этом прочие нуклеиновые кислоты, позволяет заметно повысить чувствительность экспериментов по молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот, так как исходное количество ДНК-мишени, оставаясь неизменным, обеспечивает практически неограниченную возможность отжигаться на ней все новым химерным ДНК-РНК-ДНК олигонуклеотидным зондам, представленным в реакционной смеси в большом избытке. При этом формируется гетеродуплекс РНК/ДНК, РНК цепь которого разрушается РНКазой Н, освобождая место на ДНК-мишени для таких же новых зондов и обеспечивая тем самым желаемую цикличность процесса. Причиной ограниченного применения ТЦП послужило то, что изначально предложенный метод и его дальнейшие модификации (за исключением последних) были рассчитаны на довольно трудоемкую детекцию радиоактивных фрагментов, причем гетерогенных по размеру. Вторым недостатком этого метода служило то, что в нем использовалась мезофильная РНКаза Н *E. coli*, не позволяющая проводить реакцию при повышенных температурах, обеспечивающих большую специфичность. Но не так давно американская фирма Epicentre Technologies под торговой маркой Hybridase стала поставлять термостабильную РНКазу Н *Thermus thermophilus*, ген которой был ранее клонирован (Itaya, Kondo, 1991).

Исходя из этого, нами было принято решение в имеющейся у нас фаговой клонотеке термофильной бактерии *Thermus flavus* идентифицировать клон, несущий ген РНКазы Н и создать на его основе штамм-суперпродуцент. С этой целью к консервативным участкам гена РНКазы Н были синтезированы олигонуклеотидные праймеры, а также синтезирован специальный химерный РНК/ДНК зонд в виде олигонуклеотидной шпильки, одна из цепей стержня которой представляла собой рибоолигонуклеотид, формируя тем самым гетеродуплекс РНК/ДНК, готовый к разрушению РНКазой Н. Еще одной особенностью данной шпильки было то, что она несла на своих сближенных 5'- и 3'-концах универсальный гаситель и флуоресцентный краситель, свечение которого было загашено до тех пор, пока РНКаза Н не проявляла свою активность. Высеванная на чашки Петри клонотека (около 100 тысяч фаговых бляшек) была поделена на зоны, из которых по отдельности выделялась ДНК и готовились белковые экстракты, которые прогревались при 98⁰С в течение 10 мин с целью инактивации всевозможных термолabile нуклеаз *E. coli*. Детекция РНКазы Н *T. flavus* в пробах проводилась в режиме реального времени в ДНК амплификаторе с оптическим модулем iCycler iQ (Bio-Rad, США), при которой в экстрактах из отдельных секторов фагового газона наблюдалось накопление флуоресцентного сигнала за счет разрушения РНК/ДНК шпильки. Дополнительным подтверждением нахождения гена РНКазы Н в анализируемой зоне служила ПЦР со специфичными праймерами.

Литература

- 1 Duck P., Alvarado-Urbina G., Burdick B, Collier. B. Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides // BioTechniques. 1990. V. 9. P.142-148.
- 2 Itaya M., Kondo K. Molecular cloning of a ribonuclease H (RNase HI) gene from an extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8: a thermostable RNase H can functionally replace the *Escherichia coli* enzyme in vivo // Nucl. Acids Res. 1991. V.19. P.4443-4449.

Изучение ферментных препаратов из *Aspergillus awamori* и изучение их свойств

Самышкина И.В., ШUTOва В.В.

студент

Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия

e-mail: vshutova@yandex.ru

В настоящее время во многих отраслях промышленности нашли применение ферментные препараты, что обеспечивает значительное ускорение технологических процессов, улучшает качество и повышает сортность продуктов, уменьшает расход сырья, увеличивает выход готовой продукции, улучшает условия труда, повышает его производительность и в ряде производств позволяет перевести технологические процессы на непрерывный поток. По интенсивности использования в различных отраслях народного хозяйства амилазы занимают первое место среди других ферментов, ибо во многих производственных процессах при обработке различных видов сырья возникает необходимость в более или менее глубоком расщеплении крахмала.

Целью экспериментальной работы стало выделение ферментов амилолитического комплекса микроскопического гриба *Aspergillus awamori* и изучение их свойств. Было изучено влияние pH на ферментативную активность гриба, а также термостабильность и температурную зависимость активности амилолитических ферментов.

Культуральную жидкость гриба *A. awamori* получали глубинным культивированием на питательной среде Чапека с 10% крахмала на качалке со скоростью 200 об/мин при температуре 25-26°C в течение семи суток. Для засева использовали 10% вегетативного посевного материала. Далее проводили осаждение ферментов из раствора водоотнимающими средствами, нарушающими гидратацию: ацетоном, спиртом и сульфатом аммония и изучали свойства осадка амилолитических ферментов.

Осаждение ферментов *A. awamori* показало, что наибольший выход амилолитических ферментов наблюдался при соотношении культуральной жидкости и спирта 1 : 3,5; культуральной жидкости и ацетона 1 : 2,0. По сравнению с осаждением ферментов спиртом осаждение ацетоном является менее эффективным, т. к. основные показатели амилолитической и глюкоамилазной активностей ферментного препарата значительно ниже.

Оптимальным значением для выделения ферментов является pH равный 5,0. При этом удельная активность возрастала, что показывает большую степень их очистки.

Наиболее эффективное выделение амилолитических ферментов гриба *A. awamori* наблюдалось при их осаждении сульфатом аммония, что может быть использовано при осаждении ферментов в промышленности.

Оптимальными условиями действия очищенного ферментного препарата, полученного в результате осаждения органическими растворителями и солью сульфата аммония являются: pH 5,0, температура 50°C. В этих условиях сохраняется максимальная амилолитическая и глюкоамилазная активности. Ферменты амилолитического комплекса являются термостабильными и сохраняют свою активность после нагревания в течение 90 минут при 50 °C. При температуре 80 °C происходит полная инактивация амилазы и глюкоамилазы после выдержки при этой температуре в течение 30 минут.

Исследование взаимодействия белка At-4/1 с транспортными белками вирусов растений *in vitro***Гарушняц С.К., Минина Е.А., Соловьев А.Г., Морозов С.Ю.**

Студентка 3-го курса

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: grushanka@fbbmsu.ru

Межклеточный транспорт является одним из ключевых процессов в организме. Транспорт макромолекул между клетками растений происходит через плазмодесмы, специализированные каналы, соединяющие соседние клетки в единый симпласт (Ding, 1992).

Существует множество не прямых наблюдений, позволяющих предположить, что для перемещения по растению вирусы используют существующие в растениях механизмы специфического транспорта. Таким образом изучение механизмов транспорта вирусов позволяет понять процесс межклеточного специфического транспорта растений.

В ходе исследования свойств транспортного белка NSm вируса пятнистой вялости томата был обнаружен белок At-4/1 *Arabidopsis thaliana*, способный взаимодействовать с NSm в условиях дрожжевой двугибридной системы (von Bargaen et al., 2001). Полученные в дальнейшем данные показывают, что белок At-4/1 (1) имеет специфические сигналы локализации в плазмодесмах; (2) способен транспортироваться через микроканалы плазмодесмы; (3) взаимодействует с несколькими несходными вирусными транспортными белками. Эти свойства делают белок At-4/1 уникальным кандидатом на роль одного из ключевых белков, участвующих в транспорте полипептидов через плазмодесмы.

В данной работе роль белка At-4/1 *Arabidopsis thaliana* в транспорте изучалась на примере его взаимодействия с транспортным белком 30K вируса табачной мозаики (ВТМ). 30K - это небольшой мультифункциональный белок, структура которого подробно изучена (Waigmann et al., 1994). Целью работы было изучение взаимодействия белка At-4/1 *in vitro* с белком 30K.

С помощью метода Фар-вестерн было показано наличие взаимодействия между изучаемыми белками.

Литература

- 1 von Bargaen, S., Salchert, K., Paape, M., Piechulla, B. and Kellmann, J.-W. (2001) Interactions between the tomato spotted wilt virus movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 1083-1093.
- 2 Ding B., Turgeon R., and Partharathy M.V. (1992) Substructure of freeze-substituted plasmodesmata *Protoplasma* 169, 28-41.
- 3 Waigmann, E., Lucas, W. J., Citovsky, V. & Zambryski, P.(1994). Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91, 1433-1437.

Идентификация генов термостабильной НАД-зависимой ДНК лигазы и *uvrD* геликазы в фаговой клонотеке *Thermus flavus***Билалов Фаниль Салимович**

аспирант

Институт биохимии и генетики Уфимского Научного Центра РАН, Уфа, Россия

E-mail: bilalov@bk.ru

Предложенная полтора десятилетия назад лигазная цепная реакция (Barany F, 1991) оказалась, по существу, незаслуженно забытой и одной из главных причин тому послу-

жили трудности в детекции продуктов ЛЦР. Осуществленный нами перевод этой реакции в режим реального времени позволяет надеяться на ее возвращение в ряд основных диагностических методов, тем более что ЛЦР имеет перед ПЦР заметное преимущество при детекции РНК. Несмотря на то, что в настоящее время клонировано и секвенировано немало генов термостабильных ДНК лигаз, все они несколько отличаются по своим характеристикам и поэтому исследование еще одного такого фермента и создание на его основе штамма-суперпродуцента представляет определенный интерес. В этой связи, нами было принято решение субклонировать ген термостабильной ДНК лигазы *Thermus flavus* из имеющейся у нас клонотеки. Другим термостабильным ферментом, представляющим не меньший интерес, является *uvrD* геликазы (Hiramatsu et al., 1997), благодаря недавно показанной возможности проводить с ее помощью ПЦР в изотермических условиях, называемую еще "холодной" [An et al., 2005]. После высева на чашки Петри клонотеки (около 100 тысяч фаговых бляшек) из отдельных секторов выделяли ДНК и готовили белковые экстракты, которые прогревались при 98°C в течение 10 мин с целью инактивации всевозможных термолабильных нуклеаз *E.coli*. Для выявления сохраняющейся после такой обработки ферментативной активности были приготовлены специальные флуоресцентные олигонуклеотидные конструкции, в которых за счет регистрируемого в реальном времени в ДНК амплификаторе с оптическим модулем iCycler iQ (Bio-Rad, США) переноса флуоресцентной резонансной энергии от красителя-донора к красителю-акцептору, входящих в состав соседних олигонуклеотидов в случае ДНК лигазы и эффекта дегашения за счет раскручивания фрагмента ДНК с флуорохромом и его гасителем в случае геликазы, происходила идентификация зон, содержащих бляшки с искомыми генами. Дополнительным подтверждением нахождения генов ДНК-лигазы и *uvrD* геликазы в анализируемых секторах служила ПЦР со специфичными праймерами. Другой способ детекции клонированной ДНК лигазы заключался в комплементации, имевшей место при трансформации рекомбинантной ДНК штамма *E.coli* GE 1731 (любезно предоставленного проф. G. Eggertsson), собственная ДНК лигаза которого не работает при 42°C.

Литература

- 1 Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991. V.88. P.189-93.
- 2 Hiramatsu Y., Kato R., Kawaguchi S., Kuramitsu S. Cloning and characterization of the *uvrD* gene from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8 // Gene. 1997. V199. P. 77-82.
- 3 An L., Tang W., Ranalli T.A., Kim H-J., Wytiaz J., Kong H. Characterization of a thermostable *uvrD* helicase and its participation in helicase-dependent amplification // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 28952-28958.
- 4 Thorbjarnardottir S.H., Jonsson Z.O., Andreeson O.S., Kristjansson J.K., Eggertsson G., Palsdottir A. Cloning and sequence analysis of the DNA ligase-encoding gene of *Rhodothermus marinus*, and overproduction, purification and characterization of two thermophilic DNA ligases // Gene. 1995. V.161. P. 1-6.

ПОДСЕКЦИЯ «БИОИНФОРМАТИКА»

Correlation between the hydrophobicity of subunits of ATPsynthases and the content of purines in their genes

Niyazova Raigul Esengeldievna

Teacher, candidate of Biological sciences West-Kazakhstan State University, Kazakhstan

E-mail: RAIGULN@rambler.ru

The fundamental results of properties of biopolymers have been shown with the utilization of bioinformatics approach to analysis of nucleotide and amino acid sequences [1-4].

Amino acid sequences determine structure and properties of each protein [5].

We have studied the hydrophobic properties of subunits of ATPsynthase of the chloroplasts and mitochondria of plants with known sequences of amino acids and nucleotides of genes, coding subunits of ATPsynthase.

In this paper we have used methods of bioinformatics for discovery correlation between relative content of purines in genes coding subunits of ATPsynthase of bacterium, chloroplasts and mitochondria of plants and hydropathy index of subunits took into account one amino acid.

We have used nucleotide sequences of genes of 8 subunits of ATPsynthase of 16 kinds of bacterium and 18 kinds of plants. Bacteria were separated into two groups depending on (A+T) content of nucleotide in genes of subunits. Genes of subunits were transmitted into appropriate amino acid sequences, and the hydrophobicity indexes of proteins have been calculated. A hydrophobicity indexes of amino acids have been borrowed from work [6], with some modifications for next amino acids: Arg (-1,5), Asp (-5,1), Cys (-0,3), Gln (-2,4), Glu (-4,0), Leu (4,5), Phe (4,5), Pro (1,0), Thr (0,3), Val (3,4).

The receiving data of hydrophobicity index of subunits of ATPsynthase of bacteria (A, B, D, E, F, G, H, I), chloroplasts (A, B, D, E, F) and mitochondria (A, I, H) showed that the increase of content of purines in genes correlated with more hydrophilic character of subunits.

The level of linear correlation is similar for ATPsynthase of bacteria, chloroplasts and mitochondria of plants and describes by equations:

$$H = -12,8(R-0,5)+0,68, r=0,87,$$

$$H = -12,1(R-0,5)+0,70, r=0,86 \text{ (for ATPsynthase of chloroplasts);}$$

$$H = -12,6(R-0,5)+0,63, r=0,87 \text{ (for ATPsynthase of mitochondria);}$$

$$H = -14,1(R-0,5)+0,59, r=0,82 \text{ (for ATPsynthase of bacteria (A+T));}$$

$$H = -10,2(R-0,5)+0,28, r=0,80 \text{ (for ATPsynthase of bacteria (G+C))}$$

REFERENCES

1. Karlin S., Cardon L.R. "Computational DNA sequence analysis" // Annu. Rev. Microbiol., 1994, V.48. P. 619-654
2. Holm L., Sander C. "Protein folds and families: sequence and structure alignments" // Nucl. Acids Res., 1999, V.27. P. 244-247
3. Гельфанд М.С., Миронов А.А. "Вычислительная биология на рубеже десятилетий" // Молекулярная биология, 1999, № 33. С. 969-984
4. Иващенко А.Т., Иващенко Т.А. "Закономерности использования нуклеотидов в ДНК. Геном хлоропластов *M. polymorpha*" // Биотехнология. Теория и практика, 1999, № 1-2 (9-10). С. 50-57
5. Varfolomeev S.D., Uporov I.U., Fedorov E.V. "Bioinformatics and molecular modeling in chemical enzymology. Active sites of hydrolases" // Biochemistry (Moscow) On-Line, 2002
6. Kyte J., Doolittle R.F. "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein" // J. Mol. Biol., 1982, V.157. P. 105-132

Холестерин-связывающие сайты в трансмембранных доменах интегральных мембранных белков, участвующих в фагоцитозе и/или способных к агрегации в липидных рафтах

Чеканов Николай, Чешев Дмитрий

Студенты III курса

*Факультет Биоинженерии и Биоинформатики МГУ им. Ломоносова, Москва, РФ
chekanov@belozersky.msu.ru, m_kondr@list.ru*

В работе (Li H., Papadopoulos V. // Endocrinology. 1998. V. 139. P. 4991–4997) был исследован сайт связывания холестерина у бензодиазепинового рецептора, присутствии этого участка в его С-терминали было необходимо и достаточно для транспорта холестерина через митохондриальную мембрану; кроме того, аналогичная последовательность обнаружена у других взаимодействующих с холестерином белков. Основываясь на

этих данных, мы провели анализ аминокислотных последовательностей фагоцитозного рецептора Fc gamma R, нескольких ионных каналов, предположительно участвующих в фагоцитозе (IRK, пуринорецепторы) и белков, агрегирующих в липидных рафтах (коннексины, MIP26). Есть предположение (Kono H. et al. // J. Immunol. 2002. V. 169. P. 193-203.), что именно слияние рафтов запускает биохимический сигнальный каскад фагоцитоза, первым событием которого является фосфорилирование Fc gamma R, происходящее в рафтах. Роль ионных каналов до сих пор не ясна, однако у них обнаружено изменение активности и других параметров во время фагоцитоза (Дунина-Барковская А. // Биол. Мембраны. 2004. Т. 21. С. 243-270.); также понятно, что временные локальные изменения селективной проницаемости мембраны могут вызывать соответствующие изменения мембранного потенциала и примембранной концентрации ионов в «фагоцитозной» области или в области образования псевдоподий.

Полученные нами данные позволяют предполагать наличие в перечисленных белках характерного холестерина-связывающего сайта, и то, что ведущую роль в образовании контакта играют несколько аминокислот, способных к стекинг-взаимодействию. Присутствие в трансмембранном домене аминокислотной последовательности, потенциально способной взаимодействовать с холестерином, означает, как минимум, что такое взаимодействие возможно.

Наличие холестерин-связывающих участков в трансмембранных доменах белков, участвующих в фагоцитозе, может помочь в объяснении молекулярного механизма зависимости этого процесса от холестерина.

Таксон-специфическая регуляция SOS-ответа у (-протеобактерий

Сычёва Лада Викторовна, Пермина Елизавета Алексеевна

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

Государственный научный центр ГосНИИгенетика, Россия

E-mail: ladasychova@rambler.ru

Система SOS-ответа – каскад последовательных реакций, индуцируемых повреждением ДНК клетки [1]. Гены, непосредственно участвующие в реализации этих реакций, регулируются белком LexA, который связывается со специфической последовательностью в их 5'-некодирующей области.

Наличие такой последовательности в регуляторной области гена и является критерием, по которому с помощью специальных методов можно выявить потенциально регулируемые SOS-ответом гены.

В данной работе использовался метод сравнительного анализа регуляции [2]. В геномных последовательностях был проведён поиск потенциальных регуляторных сайтов. Вес сайта вычислялся при помощи матрицы позиционных весов (МПВ), которая строилась по формуле

$$W(b,k) = \log [N(b,k) + 0.5] - 0.25 \sum_{i=A,C,G,T} \log [N(i,k) + 0.5],$$

где $N(b,k)$ – количество появлений нуклеотида b в позиции k .

Вес предполагаемого сайта считался как сумма нуклеотидных весов в соответствующих позициях:

$$Z(b_1 \dots b_k) = \sum_{k=1 \dots k} W(b_k, k),$$

где k – длина сайта.

Гены, регулируемые LexA, входят в единый регулон. Предположение о консервативности регулона внутри группы филогенетически близких организмов лежит в основе исследования регулонов у тех организмов, экспериментальные данные о которых исчерпываются последовательностью ДНК их геномов.

В данной работе изучены гены, регуляция которых специфична для геномов конкретной таксономической группы (*Enterobacteriales*, *Pasteurellales*, *Vibrionales*,

Pseudomonadales и *Alteromonadales*). Среди них обнаружены гены, для которых ранее не было показано участие в SOS-ответе, но которые имеют консервативный сайт в регуляторной области и функцию, возможно задействованную в реакции клетки на повреждение ДНК. Среди таких генов: *mfd*, продукт которого в случае остановки транскрипции из-за повреждения ДНК способствует репарации матричной цепи, ген VC0082, продуктом которого является рекомбиназа, VP2449, отвечающий за резистентность к воздействию ксенобиотиков. Таким образом, описаны состав и эволюция LexA-регулона в γ -протеобактериях.

Литература

- 1 Walker C.G. (1996) The SOS response of *Escherichia coli*. *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Vol. 1. ASM Press, Washington, DC, pp. 1400-1412 Chapter 89.
- 2 Гельфанд М.С., Миронов А.А. (1999) Компьютерный анализ регуляторных сигналов в полных бактериальных геномах // Молекулярная биология, № 33

Потоковая модель метаболизма аминокислот кишечной палочки

Любецкая Анна Васильевна

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия.

E-mail: kica_anka@list.ru

С помощью программы, реализующей потоковую модель метаболизма кишечной палочки, было выяснено, как реагирует ее метаболизм в ответ на добавление аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин, лейцин, изолейцин, валин, гистидин, лизин, треонин, цистеин, метионин, аргинин, пролин) к бедной среде, а также среде, лишенной источников углерода, азота или углерода и азота одновременно.

В результате была показана сходная реакция метаболической системы на добавление различных аминокислот к бедной среде. Растут потоки гликолитического пути и синтез пирувата с последующей деградацией до ацетата через ацетилкофермент А, уменьшаются потоки через пентозофосфатный путь и цитратный цикл.

В качестве источников углерода и/или азота могут выступать три аминокислоты из исследованных тринадцати: аргинин, треонин и триптофан.

При росте на аминокислотах как единственных источниках углерода нарастает путь от фосфоенолпирувата к глюкозо-6-фосфату; поток через пентозофосфатный путь направлен в сторону рибулозо-5-фосфата. Остальные изменения зависят от того, какие базовые метаболиты являются продуктами данной аминокислоты, то есть, от «точки входа» катаболического пути в основной метаболизм.

При росте на аминокислотах как единственных источниках азота в среде при небольших количествах добавленной аминокислоты потоки изменяются таким образом, что компенсируется недостаток аммония. Но при дальнейшем добавлении аминокислоты появляется избыток аммония, который выводится из клетки. В то же время в большом количестве синтезируются вещества, способные заменить глюкозу.

Тем самым, при добавлении аминокислоты быстрее компенсируется нехватка ионов аммония, после чего клетка начинает использовать аминокислоты как дополнительный субстрат для роста.

В случае отсутствия как глюкозы, так и ионов аммония рост определяется потоками, компенсирующими нехватку глюкозы. Таким образом, лимитирующим фактором является недостаток углерода, а не азота.

Литература

- 1 Ibarra R.U., Edwards J.S., Palsson B.O. (2002). *Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. *Nature*, 420, 186-189.
- 2 Гельфанд М.С. (2005). Регуляция экспрессии генов и электронные модели живой клетки. *Информационные процессы*, 5(1), 33-39.
- 3 Papin J.A., Price N.D., Palsson B.O. (2004) in *Metabolic Engineering in the Post Genomic Era* (Kholodenko B.N., Westerhoff H.V. Hethersett, ed.), Horizon Bioscience, pp 209 - 234.
- 4 Moreira dos Santos M., Akesson M., Nielsen J. (2004) in *Metabolic Engineering in the Post Genomic Era* (Kholodenko B.N., Westerhoff H.V. Hethersett, ed), Horizon Bioscience, pp 89 - 105.
- 5 Edwards J.S., Ibarra R.U., Palsson B.O. (2001). In silico prediction of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nat. Biotechnol*, 19, 125-130.

Поиск кластеров сайтов связывания регуляторов транскрипции у эукариот

Перцовская Инна Михайловна, Никулова Анна Алексеевна

студенты ФББ МГУ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: nikanka@gmail.com

Транскрипция генов в эукариотах часто регулируется группой факторов транскрипции, связывающихся с определенными участками ДНК – регуляторными сайтами, которые часто образуют между собой кластеры. При этом статистическая значимость появления отдельных сайтов невысока, тогда как значимость кластеров значительно выше. Поэтому необходимо, проанализировав доступную в базах данных и литературе информацию, исследовать корреляцию расположения сайтов связывания факторов транскрипции как внутри одного генома, так в гомологичных областях близких геномов. Это позволит выявить закономерности регуляции транскрипции у высших эукариот, что является чрезвычайно актуальной задачей, т.к. данная проблема на сегодняшний день недостаточно хорошо изучена и представляет большой практический интерес.

В качестве объектов исследования были выбраны геномы человека и мыши. Мы провели анализ распределения сайтов связывания 16 различных факторов транскрипции на выборке предгенных участков регулируемых ими генов (25 человеческих и 25 гомологичных им мышинных генов). Для поиска регуляторных кластеров мы использовали новый метод, разработанный в нашей лаборатории. Эффективность этого подхода была ранее показана на хорошо охарактеризованных генах *Drosophila melanogaster*: была обнаружена неслучайность распределения отдельных сайтов, предпочтение соседства некоторых сайтов связывания и преобладание определенных расстояний между ними.

В данной работе подтвердились ранее полученные результаты, однако, также был обнаружен ряд неожиданных закономерностей. Так, например, далеко не все рассмотренные сайты участвуют в формировании кластеров, что говорит о том, что регуляция транскрипции многих генов происходит в результате единичного, но точного связывания фактора с регуляторным участком. Есть случаи обнаружения достаточно сильных кластеров перед теми генами, для которых нет данных о регуляции этими факторами. К тому же, заметная доля контрольных последовательностей (случайных участков генома) несет статистически весьма значимые кластеры сайтов, и, более того, распределение расстояний между ними также весьма не случайно. Что касается близости между человеческим и мышинным аппаратами регуляции, то они, по-видимому, не настолько похожи, как ожидалось. Причем, скорее всего, регуляторные отношения между факторами и их генами все-таки сохраняются у близких видов, но их реализация подвержена достаточно значительному изменению. В целом, проведенное исследование показало, что в основе регуляции транскрипции у эукариот лежат более сложные закономерности, чем ожидалось ранее, и они требуют дальнейшего глубокого изучения.

Литература

- 1 Murakami K, Kojima T, Sakaki Y. Assessment of clusters of transcription factor binding sites in relationship to human promoter, CpG islands and gene expression. BMC Genomics 2004, 5:16.
- 2 Edited by Michael R. Barnes and Ian C. Gray. Bioinformatics for Geneticists, 2003.
- 3 Peter R. Cook Nongenic transcription, gene regulation and action at a distance. Journal of Cell Science 116, p. 4483-4491.
- 4 T. Cremer and C. Cremer. Chromosome Territories, Nuclear Architecture and Gene Regulation in Mammalian Cells. Nature Reviews, 2001.

Регуляция дыхания у энтеробактерий: сопоставление данных по анализу экспрессии на биочипах и сравнительно-геномного анализа

Цыганова Марина Олеговна

студентка 3 курса

Равчев Дмитрий Андреевич

аспирант 3 года обучения

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Электронная почта: marusya_tula@mail.ru

В настоящее время для исследования экспрессии генов часто применяется метод биочипов, позволяющий одновременно получить информацию о работе большого числа генов и обработать эту информацию. Что касается прокариот, метод биочипов предоставляет данные о составе модулона, то есть группы генов, экспрессия которых изменяется при мутации в гене регуляторного белка или при изменении условий среды. В случае регуляции в состав модулона входят гены, экспрессия которых напрямую или опосредованно регулируется некоторой регуляторной системой. В отличие от модулона, регулон это группа генов, экспрессия которых непосредственно регулируется некоторой регуляторной системой. Интуитивно понятно, что в состав модулона должно входить большее количество генов, чем в состав соответствующих регулонов. Одной из причин этого является существование в клетке различных регуляторных каскадов.

Для оценки вклада регуляторных каскадов в расширение модулонов по сравнению с соответствующим регулоном были исследовали Fnr- и ArcA-регулоны и модулоны энтеробактерии *Escherichia coli* K12. ArcA и Fnr являются факторами регуляции транскрипции, контролирующими переключение между аэробным и анаэробным метаболизмами. Известно также, что экспрессия гена *arcA* контролируется белком Fnr.

В данной работе был проведен сравнительный анализ данных о составе Fnr- и ArcA-модулонов, полученных экспериментально с помощью метода биочипов [1, 2], и данных о составе Fnr- и ArcA-регулонов, полученных с помощью сравнительно-геномного подхода. Ген считался членом регулона, если он входил в состав модулона и, одновременно с этим, имел в регуляторной области консервативный сайт. Показано, что регуляторный каскад с участием белков Fnr и ArcA вносит существенный вклад в расширение Fnr-модулона по отношению к Fnr-регулону за счет оперонов ArcA-модулона. Кроме того, обнаружено 26 оперонов с консервативными сайтами связывания Fnr и 16 оперонов с консервативными сайтами связывания ArcA. На основании данных о составе Fnr- и ArcA-регулонов была выделена группа генов, так называемое “ядро”, с высоко консервативными сайтами связывания Fnr и ArcA и высокими значениями весов для этих сайтов.

Литература

- 1 Salmon K., Hung S.P., Mekjian K., Baldi P., Hatfield G.W., Gunsalus R.P. (2003) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR // Journal of Biological Chemistry, 278(32), p. 29837-29855.

2 Salmon K., Hung S.P., Steffen N.R., Krupp R., Baldi P., Hatfield G. W., Gunsalus R.P. (2005) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: The effects of oxygen availability and ArcA // *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), p. 15084-15096.

Анализ первичной структуры и моделирование пространственной структуры транскетолазы человека ТКТЛ1

Занегина Ольга Николаевна

аспирантка

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия.
zanolya@yandex.ru*

Целью данной работы является построение пространственной структуры транскетолазы человека ТКТЛ1 по гомологии с расшифрованными пространственными структурами транскетолаз *S. cerevisiae*, *E. coli*, *Zea mays* и *Leishmania mexicana*.

Изучение транскетолазы-L1 представляет интерес для онкогенеза в связи с тем, что в отличие от других, ее уровень экспрессии в опухолевых клетках увеличивается, что позволяет рассматривать её в качестве маркера. На данный момент третичная структура ни одной из трех транскетолаз человека не расшифрована. Первичная структура транскетолазы ТКТЛ1 существенно отличается от других делецией в N-концевом домене и вставкой в С-концевом. Это не позволяет построить ее пространственную структуру, используя стандартные программы.

Первичная структура транскетолазы-L1 представлена в банке UniProt двумя различными последовательностями: аннотированной и неаннотированной, существенно различающимися между собой. Аннотированная последовательность, кроме отмеченной делеции в N-концевом домене и небольшой вставки в С-концевом отличается от неаннотированной дополнительной делецией N-концевого участка первого (N-концевого домена) и вставкой в С-концевом. В связи с этим встала задача выбора первичной структуры транскетолазы-L1 человека.

Построение выравнивания с ортологичными транскетолазами показало, что ни в одном ферменте не наблюдается одновременная делеция в середине N-концевого домена и делеция его N-конца, образующего гидрофобное ядро домена. Наличие таких делеций привело бы к существенному сокращению и перестройке N-концевого домена, образующего каталитический центр фермента. Существенно, что для N-концевого участка транскетолазы ТКТЛ1 были найдены EST (expressed sequence tags), что говорит о транскрипции этого участка.

Вставка в С-концевом домене аннотированной последовательности является уникальной и не была встречена ни в одной другой последовательности транскетолаз, что ставит под сомнение её существование. В то же время в неаннотированной последовательности такая вставка отсутствует. Поскольку неаннотированная последовательность в отличие от аннотированной содержит N-концевой участок и не содержит дополнительной вставки, было решено использовать ее для построения пространственной структуры транскетолазы ТКТЛ1.

Построение полной пространственной модели ТКТЛ1 с помощью сервера Swiss-Model¹ невозможно, т.к. транскетолаза ТКТЛ1 человека существенно отличается от транскетолаз с известной пространственной структурой. Тем не менее возможно построение структуры по гомологии частей (доменов) белка человека с белками *E.coli*. Первый и второй домены были построены на основе транскетолазы *E.coli*, линкер между ними и третий домен – на основе пируват дегидрогеназы *E.coli*. Таким образом была получена пространственная структура субъединицы транскетолазы ТКТЛ1 человека.

¹ <http://swissmodel.expasy.org/>

В ходе дальнейшей работы планируется проверка полученной модели молекулярной динамикой.

Предсказание специфичности новых членов белковых семейств с помощью специфичность-детерминирующих позиций (СДП), определенных методом SDPpred. Программа SDP-profile

Коборова О.Н. студентка третьего курса факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ; *Калинина О.В.* аспирантка факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ; *Рахманинова А.Б.* к.б.н., старший преподаватель факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова
okoborova@yandex.ru

Многие белковые семейства содержат белки, имеющие одну и ту же общую биохимическую функцию, но разную специфичность к лиганду - они взаимодействуют с похожими, но разными малыми молекулами, участками ДНК или другими белками.

В группе, в которой выполнена данная работа, был разработан метод SDPpred [1], с помощью которого можно предсказать аминокислотные остатки, отвечающие за эти различия в функциональной специфичности. Возможности метода SDPpred были исследованы на примере семейства аденилат- и гуанилатциклаз. В результате большинство предсказанных позиций согласуются с ранее опубликованными вычислительными, экспериментальными и структурными данными.

Интересно предсказать специфичность тех белков семейства, для которых она не очевидна (нет экспериментальных данных о функциях этих белков или разные экспериментальные источники дают противоречивые характеристики исследуемого белка и т.д.).

Для этого была написана программа SDP-profile, которая на основе полученного набора позиций, определяющих специфичность (СДП), предсказанных методом SDPpred, строит СДП-профиль и предсказывает принадлежность изучаемого белка, специфичность которого не очевидна, к той или иной группе специфичности.

Тестирование показало, что программа уверенно относилась белки из обучающей выборки к правильным подсемействам.

Программа была использована для предсказания специфичности ряда белков некоторых прокариот и ресничных, про функции которых известны крайне противоречивые экспериментальные данные. Большинство циклаз ресничных было отнесено к аденилатциклазам. Однако, в одной из ключевых для связывания субстрата [2] позиций для одного из двух каталитических доменов белков встречается глутаминовая кислота, характерная для гуанилатциклаз в данной позиции. Таким образом, полученные результаты согласуются с изначальным предположением авторов [3] об особом роде гуанилатциклазах ресничных. Полученные нами результаты для циклаз из *Treponema*, *Stigmatella*, микобактерий и цианобактерий позволяют предположить, что большинство из них действительно аденилатциклазы. Это противоречит предположению, сделанному в [4], но согласуется с принятой в настоящее время точкой зрения [5].

Литература

- [1] Kalinina O.V, Mironov A.A., Gelfand M.S., Rakhmaninova A.B. (2004)
- 2 Automated selection of positions determining functional specificity of proteins by comparative analysis of orthologous groups in protein families. *Protein Science*, 13: 443-456.
- 3 [2] Sunahara K. Roger, Beuve Annie, Tesmer J.G. John, Sprang R. Stephen, Garbers L. David, and Gilman G. Alfred.(1998)
- 4 Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26): 16332-16338.
- 5 [3] Linder JU, Engel Peter, Reimer Andreas, Krüger Thomas, Plattner Helmut, Shultz Anita and Shultz E. Joachim. (1999)

- 6 Guanylyl cyclases with the topology of mammalian adenylyl cyclases and an N-terminal P-type ATPase-like domain in Paramecium, Tetrahymena and Plasmodium. The EMBO Journal, 18(15): 4222-4232.
- 7 [4] McCue Lee Ann, McDonough Kathlee A., and Lawrence Charles E. (2000)
- 8 Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in Mycobacterium tuberculosis. Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN, 10: 204-219.
- 9 [5] Shenoy AR, Srinivasan N., Subramanian M., Visweswariah SS (2003)
- 1 Mutational analysis of the Mycobacterium tuberculosis Rv1625c adenylyl cyclase: residues that confer nucleotide specificity contribute to dimerization. FEBS Letters, 545: 253-259.

Влияние регуляторных белков на экспрессию гена глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* в рекомбинантных штаммах *B. subtilis*.

***Шагимарданова Елена Ильясовна, Частухина Инна Борисовна,
Шаринова Маргарита Рашидовна***

*Казанский государственный университет, биолого-почвенный факультет, Казань, Россия
e-mail: rjuka@mail.ru*

Достижения последних лет в области биохимии и молекулярной биологии позволили установить свойства многих белков, их субстратную специфичность, третичную структуру, механизм каталитического действия. В настоящее время интересы исследователей лежат в области закономерностей регуляции биосинтеза биологических молекул, а особенно ферментов деградации белков и нуклеиновых кислот. Настоящая работа посвящена изучению экспрессии гена узко специфичной сериновой протеиназы бацилл – глутамилэндопептидазы. Ген глутамилэндопептидазы *B.intermedius* был клонирован на многокопийной плазмиде pV и трансформирован в рекомбинантный штамм *B. subtilis*, дефектный по собственным внеклеточным протеиназам. Наряду с накоплением фермента в стадии замедления роста (22час) нами обнаружены два пика глутамилэндопептидазной активности в стационарной фазе, соответствующие 48 и 78 часы роста, причем, уровень ферментативной активности на 48 и 78 часы роста превышает таковой на 22 час в 2 и 4 раза, соответственно. Это может быть обусловлено сменой механизмов регуляции на разных стадиях клеточного цикла бактерий. Ранее было показано, что ранний фермент подвержен влиянию катаболитной репрессии легкоусвояемым источником углерода. Напротив, поздний фермент оказался нечувствительным к этому фактору, уровень накопления фермента не изменялся при добавлении экзогенной глюкозы после 20 часа роста культуры. Секвенирование гена глутамилэндопептидазы *B. intermedius* позволило провести анализ его промоторной области. Нами были обнаружены потенциальные сайты для взаимодействия с белком катаболитного контроля *SsrA*, плейотропным репрессором ранних генов спорообразования *AbtB*, а также различными σ -факторами транскрипции. Кроме того, было идентифицировано множество последовательностей, имеющих высокую гомологию к *Spo0A*-боксу. Причем, разные регуляторные последовательности имеют перекрывающиеся области, что также свидетельствует о смене путей регуляции. Полученные данные послужили основой для проведения экспериментов с мутантными штаммами, дефектными по регуляторным белкам инициации спорообразования (*spo*-мутанты), а также σ -факторам РНК-полимеразы. Запуск процесса спорообразования представляет собой последовательную передачу фосфата от сенсорной гистидин-киназы к ключевому регуляторному белку – фактору транскрипции - в двухкомпонентной системе *Spo0A*-фосфопередачи. Показано, что в рекомбинантных штаммах *B.subtilis* с инактивированными *Spo0A*-белками уровень экспрессии снижается, в среднем на 30-50%. В супрессорных штаммах мутантных по двум генам *spo0A/abtB*, в которых *abtB*-мутация компенсирует дефект *Spo0A*-белка, экспрессия гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* восстанавливается и даже превышает уровень контроля в среднем на 60-80%. В совокупности эти данные свидетельствуют, что экспрессия гена глутамилэндо-

пептидазы подвергается позитивной регуляции со стороны Spo0A-белка, а регуляторный белок AbrB оказывает репрессирующее действие на транскрипцию гена *gseVi*. В штаммах *B.subtilis*, не способных к формированию различных спороспецифичных факторов транскрипции (σ^E , σ^G , σ^K , σ^F) экспрессия гена *gseVi* снижается на 50-65%. Итак, несмотря на то, что экспрессия гена *gseVi* продолжается в период споруляции, регуляция его экспрессии со стороны регуляторных белков системы Spo0A-фосфопередачи, а также спороспецифических факторов транскрипции не является выраженной. Полученные нами данные позволяют сделать заключение, что экспрессия гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* модулируется разными регуляторными системами и осуществляется по типу перекрестной регуляции.

Реконструкция эволюции белков семейства TERF

Фадеев Андрей Олегович

Студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: andreyfad@yandex.ru

TERF – семейство белков, ответственных за защиту теломерных участков хромосом и присоединение к ним других белков, входящих в состав теломерного комплекса. Изучали аминокислотные последовательности гомологов белков TERF1 и TERF2 человека. Построено множественное выравнивание белков данного семейства и на его основе – филогенетическое дерево. Показано, что появление паралогов TERF 1 и TERF 2 происходит в группе хордовых – оно есть у млекопитающих, но отсутствует у шпорцевой лягушки и рыбы-зебры. Предполагается, что у растений имеется также несколько паралогов TERF, появившихся независимо от паралогов хордовых в ходе эволюции царства растений.

Распознавание мутаций в последовательностях ДНК определенных генетических линий организма *C. Elegans*

Голосов Кирилл Владимирович, Коновалова Татьяна Геннадьевна,

Черемушкин Евгений Сергеевич, Холмс Джефф

студент, аспирант, аспирант, научный сотрудник

Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия

E-mail: {kirill, tanya, cher}@biorainbow.com,

Введение: В рамках данной работы решалась научно-практическая задача определения мутаций в геноме определенной линии организмов, полученных под воздействием различных мутагенов. После воздействия мутагена отбирались некоторые организмы (черви), обладающие определенными свойствами. Далее из этих червей выделялись участки ДНК содержащие мутацию. Но характеристики этой мутации, такие как позиции ее в геноме и тип мутации (делеция, вставка или замена) не могут быть определены таким методом. Поэтому нами была разработана программа, определяющая необходимые параметры на основе сравнения поданной ДНК с геномом *C.Elegans*.

Исходными данными для программы являются результаты секвенирования генома червя *C. Elegans*, на который воздействовали различными мутагенами представленные в виде фрагментов ДНК длиной порядка нескольких тысяч пар оснований. Задача состояла в выяснении того, какие мутации произошли в результате воздействия мутагена. Например: Из последовательности ДНК был удален фрагмент, либо один фрагмент был заменен на другой.

Для выполнения задача была разработана специально предназначенная программа на языке Perl с использованием пакета BioPerl и программ WU-Blast и e-PCR.

Алгоритмы: Последовательность нуклеотидов считывается из файла в формате fasta.

Затем происходит выравнивание входной последовательности с геномом червя *C. Elegans* посредством программы WU-Blast запускаемой функцией пакета BioPerl с определенными параметрами. WU-Blast выдает отчет с вариантами выравниваний, в том числе выравнивания с разрывами и заменами. После чего из выравниваний выстраиваются наиболее вероятные цепочки. Перед нами встала проблема следующего содержания: программа Blast иногда допускает нежелательные несовпадения на краях выравниваний. Было принято решение об удалении краев выравниваний с несовпадениями, которое было затем реализовано.

Для экспериментов используются последовательности ДНК ограниченные набором праймеров. С помощью программы e-PCR и Perl интерфейса к ней происходит поиск праймеров на геноме *C. Elegans*, который можно получить в виде fasta-файла из общедоступных ресурсов WormBase по адресу <ftp://ftp.wormbase.org/pub/wormbase/>. Таким образом получают координаты праймеров в абсолютных координатах (координаты в хромосоме). С помощью специального модуля и соответствующей базы данных было введено преобразование координат в относительные (космидные).

Заключение: Таким образом, разработанное нами приложение получая на входе последовательность ДНК *C. Elegans* на выходе выдает наиболее вероятные позиции делеций, вставок и замен ДНК, название космиды, в которой произошли эти мутации, а также относительные координаты этих мутаций в космиде.

Литература

- 1 1. <http://wormbase.org>
- 2 2. <http://doc.bioperl.org>

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ Г.МАГАДАНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНДЕКСА МАССЫ ТЕЛА

Карндашева В.О.

Младший научный сотрудник

Международный научно-исследовательский центр "Арктика" ДВО РАН, Магадан

e-mail: arktika@online.magadan.su

Целью наших исследований явилось изучение функционирования сердечно-сосудистой системы у детей и подростков Магадана в зависимости от индекса массы тела. Исследования проведены на мальчиках 11-16 лет, учащихся различных школ города. У испытуемых измеряли длину и массу тела и рассчитывали индекс массы тела по формуле: $ИМТ = МТ / ДТ^2$, где МТ – масса тела, кг; ДТ – длина тела, м². У детей регистрировали уровень артериального давления (САД и ДАД) и рассчитывали систолический и минутный объем крови по Старру. Частоту сердечных сокращений определяли пальпаторно в положении сидя. Расчетным путем определяли индекс кровообращения (ИК, мл/мин.кг), двойное произведение (ДП, ед.), внешнюю работу миокарда (ВРМ, ед.), вегетативный индекс Кердо (ВИК, %) и адаптационный потенциал системы кровообращения (АП, ед.) по А.П. Берсеновой. Всего было обследовано 1189 школьников, имеющих физическую нагрузку только на уроках физической культуры. В зависимости от показателя индекса массы тела (ИМТ) мальчики каждого возраста были разбиты на три группы: 1 группа – лица с ИМТ ниже $M-\delta$; 2- лица в пределах $\delta-M+\delta$ и 3 группа – лица с ИМТ больше $M+\delta$, где M – средняя величина ИМТ. Проведенные исследования показали, что с увеличением возраста мальчиков происходит закономерное снижение частоты сердечных сокращений и индекса кровообращения; увеличение артериального давления и систолического объема крови. Существенных различий по частоте сердечных сокращений между лицами 3-х групп в каждом возрасте не было выявлено. Уровень систолического артериального давления в каждой возрастной группе увеличивался по мере возрастания ИМТ. Так среди мальчиков

11-лет у лиц с ИМТ ниже среднего САД составлял $92,3 \pm 1,94$ мм.рт.ст., тогда как у лиц с ИМТ выше среднего – $103,2 \pm 4,42$ мм.рт.ст. Среди подростков 16-ти лет эти показатели составляли $112,4 \pm 2,33$ и $124,4 \pm 4,12$ мм.рт.ст. соответственно. Существенных различий по систолическому объему крови между лицами трех групп в каждом возрасте не обнаружено, а величина индекса кровообращения снижается по мере увеличения ИМТ. Показатель двойного произведения, свидетельствующий о функциональных резервах сердечно-сосудистой системы, имеет тенденцию к повышению у лиц с индексом массы тела выше средних величин. Это связано в основном с увеличением систолического артериального давления у лиц этой группы. Аналогичная тенденция наблюдается и в отношении показателя внешней работы миокарда. Так, например, среди мальчиков 11-ти лет у лиц с ИМТ ниже среднего ВРМ составлял $3,69 \pm 0,15$ ед., тогда как у лиц выше среднего – $4,97 \pm 0,29$ ед. соответственно. Среди подростков 16-ти лет эти показатели составляли $6,19 \pm 0,13$ ед. и $6,80 \pm 0,27$ ед. соответственно. Более высокие показатели ВРМ у лиц 3 группы по сравнению с лицами 1 и 2 групп связано с увеличением среднего артериального давления и периферического сопротивления кровотоку. Вегетативный индекс Кердо понижается по мере увеличения индекса массы тела. У лиц 1 группы наблюдается преобладание активности симпатического, у лиц 3 группы парасимпатического отдела вегетативной нервной системы. В каждой возрастной группе наблюдается отчетливая тенденция к понижению адаптационного потенциала системы кровообращения у лиц с повышенным показателем индекса массы тела. Таким образом, уже в предпубертатном и пубертатном периодах у мальчиков выявляется тенденция к повышению артериального давления и напряжению в функционировании сердечно-сосудистой системы у лиц с повышенным индексом массы тела.

Исследование обобщенного FruR-регулона гамма-протеобактерий методами сравнительной геномики

Закирянова Виоланта Владимировна

Студентка 2 курса

Равчев Дмитрий Андреевич

Аспирант 3 года

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

violanta@belozersky.msu.ru

Белок Cra (FruR) из *Escherichia coli* первоначально был открыт как репрессор *fruBKA* оперона, ответственного за импорт и фосфорилирование фруктозы. Однако позднее экспериментально было показано, что в *E.coli* Cra также репрессирует синтез белков фосфо-трансферазных систем, ферментов брожения, гликолиза и пути Энтнера-Дудорова, и активирует синтез ферментов, осуществляющих окисление субстратов, таких как ферменты глюконеогенеза и цикла трикарбоновых кислот. Таким образом, из 15 регулируемых Cra оперонов, объединяющих 29 генов, 9 репрессируются (*edd-eda*, *mtlADR*, *ptsHI-crr*, *pfkA*, *pykF*, *epd-pgk*, *fruBKA*, *nirBCD-cysG* и *adhE*), а 6 активируются (*ppsA*, *pckA*, *aceBAK*, *icdA*, *fdp* и *cydAB*) [1].

В процессе изучения эволюции Cra-регулона был исследован 21 геном из четырех порядков гамма-протеобактерий: Enterobacteriales, Pasteurellales, Pseudomonadales, Vibrionales. Также в этих организмах была предсказана регуляция и изучена ее эволюция для восьми оперонов (*nuoABCEFGHIJKLMN*, *manXYZ*, *copA*, *crp*, *pdhR-aceEF-lpdA*, *tpiA*, *gapA*, *gpmA*); из них три (*tpiA*, *pdhR*, *crp*) активируются, причем для двух из них (*pdhR* и *crp*) для рода *Yersinia* возможна амбивалентная регуляция, четыре (*manXYZ*, *copA*, *gpmA*, *nuoA-N*) репрессируются Cra (в *nuoA-N* и *copA* происходит перекрывание сайта и промотора), а тип регуляции гена *gapA* не был определен, поскольку сайт, находящийся перед промотором, расположен вплотную к -35-боксу.

При изучении эволюции регулона из него был исключен оперон *cydAB*, поскольку, во-первых, экспериментальные данные по его регуляции недостоверны, а во-вторых, сайт перед геном имеет вес ниже порогового значения и обнаружен только в *E.coli*.

У бактерий порядка Pasteurellales наблюдается полное отсутствие регулона.

В результате проведенного исследования были сделаны следующие выводы:

1. Наиболее консервативной является регуляция оперона *fruBKA*, поэтому наиболее вероятно, что Cra первоначально возник как узкоспецифичный регулятор фруктозо-фосфотрансферазной системы.

2. В геномах многих бактерий из порядка Enterobacteriales Cra регулирует гены большинства ферментов гликолиза/глюконеогенеза, а также глобальный регулятор *crp*. Достаточно консервативна регуляция генов для цикла Кребса (*icdA*), ассимиляторной нитрит-редуктазы (*nirBD*), NADH дегидрогеназы (*nuoA-N*), системы транспорта маннозы (*manXYZ*) и Cu-транспортирующей АТФазы (*copA*).

3. Для узкой группы энтеробактерий (*E.coli*, *Salmonella sp.*) характерна также регуляция генов фосфотрансферазной системы (*mtlADR*), глиоксилатного пути (*aceBAK*) и пути Энтнера-Дудорова (*edd-eda*).

Литература

1 M.H. Saier and others (1996) Regulation of carbon utilization // In: Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology, F.C. Neidhart (Eds.) 1325-1333.

Развитие базы данных ДНК/РНК-белковых взаимодействий NPIDB

Титов Михаил Львович

аспирант

ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

E-mail: mlt@iab.ac.ru

Около полутора тысяч трехмерных структур комплексов белка с нуклеиновыми кислотами находятся в базе PDB [1]. Представляется важным предоставлять исследователям в удобном виде информацию о межмолекулярных контактах между белком и нуклеиновыми кислотами, возможность сравнения комплексов. Для этой цели была создана база данных взаимодействий белков с нуклеиновыми кислотами NPIDB [2], являющаяся совместной разработкой ВНИИСБ и НИИФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ. База данных еженедельно пополняется комплексами из PDB, к ней подключено несколько разработанных нашим коллективом программ обработки структур комплексов.

За последний год совершенствовалась структура базы и средства анализа комплексов. Так, ранее работа осуществлялась только с ассиметрическими единицами, тем самым не всегда учитывались взаимодействия в “биологических единицах” – структурах, отвечающих реальным комплексам. В настоящее время база NPIDB содержит биологические единицы, извлекаемые из PDB. В частности, пользователь может получить данные о том, какие биологические единицы соответствуют каждой PDB-записи и каков их состав. Такие сервисы, как CluD (нахождение гидрофобных ядер в белках и зонах ДНК-белкового контакта), предсказание потенциальных водородных связей НК-белок и визуализация комплексов посредством Jmol [3], также были адаптированы для работы с биологическими единицами.

Существует различные классификации участков белков, в частности, базы Pfam [4] и SCOP [5]. Представляется интересной возможность получения сводной регулярно обновляемой информации об особенностях взаимодействия между белком и нуклеиновыми кислотами для каждого из семейств белковых доменов, представленных в Pfam и SCOP. База NPIDB была модифицирована для хранения информации о принадлежности ДНК-узнающих и других белковых доменов к семействам. Для каждого комплекса пользователь может получить информацию о доменах, входящих в данный комплекс, их классификации (согласно Pfam или SCOP) и о том, какие из доменов связываются с ДНК

или РНК. Кроме того, для каждого из семейств доменов, представленных в базе, можно получить информацию обо всех PDB-записях, содержащих домены данного семейства.

Описанные сервисы доступны по адресу <http://monkey.belozersky.msu.ru/NPIDB/>

Литература

- 1 H.M.Berman et al. (2000) The Protein Data Bank // Nucleic Acids Research, 28, p. 235-242 <http://www.rcsb.org/pdb>
- 2 Sergei Spirin, Anna Karyagina, Mikhail Titov, Mikhail Gribkov, Andrei Alexeevski (2005) NPIDB, a database of nucleic acid-protein complexes // Proceedings of the international Moscow conference on computational molecular biology, p. 383-384
- 3 <http://jmol.sourceforge.net/> (Jmol)
- 4 Alex Bateman et al. (2004) The Pfam Protein Families Database // Nucleic Acids Research, Database Issue 32, p. D138-D141 <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>
- 5 Lo Conte L., Brenner S. E., Hubbard T.J.P., Chothia C., Murzin A. (2002) SCOP database in 2002: refinements accommodate structural genomics // Nucl. Acid Res. 30(1), p. 264-267 <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>

Метод выявления информативных признаков

Лысенко Анастасия Игоревна

студент

Томский государственный университет, Томск, Россия

E-mail: ALID@mail2000.

Возникновение и развитие опухолей является одной из наиболее сложных проблем биологии и медицины. На начальных этапах трансформации здоровой клетки возможен возврат к состоянию нормы. В определенной мере именно работа иммунной системы определяет путь развития мутантной клетки: ее гибель или дальнейший рост. При исследовании иммунной системы приходится анализировать большое число признаков. Актуальной является задача уменьшения числа этих характеристик и выбора наиболее информативных из них, а также выявления групп «сильно» зависимых признаков.

В работе [1] рассматривается алгоритм иерархической кластеризации, опирающийся на представления теории графов. Этот алгоритм применяется для решения задачи выявления групп зависимых признаков (кластеров).

Рассмотрим следующую задачу. Пусть исследуется совокупность n объектов $x_i, i = 1, \dots, n$, каждый из которых характеризуется признаками $V_k, k = 1, \dots, K$. Требуется разбить совокупность признаков на группы взаимозависимых.

Будем интерпретировать признаки как вершины некоторого неориентированного графа. Две вершины будем считать связанными, если соответствующие признаки зависимы. В этом случае группы зависимых признаков образуют связные подграфы.

Пусть значения всех признаков измерены в числовой шкале. Тогда «теснота» связи между признаками V_p и V_q может быть описана коэффициентом детерминации между парой признаков r_{pq} . Для случая нормально распределенной пары признаков можно использовать коэффициент корреляции, который равен корню квадратному из коэффициента детерминации. Для порядковых признаков - коэффициенты ранговой корреляции Спирмэна, Кендалла, Гамма или другие. При $r_{pq} = 0$ признаки независимы, максимальное значение r_{pq} соответствует наиболее тесной зависимости. Однако одинаковым значениям этих коэффициентов могут соответствовать различные уровни значимости, поэтому более адекватно выбирать в качестве функции близости значение p -уровня. Зададим пороги кластеризации (уровни близости) $\alpha_0 < \alpha_1 < \alpha_2 < \dots < \alpha_m$. Для каждого уровня близости α_j построим матрицу связности.

При таком подходе для каждого порога кластеризации отдельные кластеры соответствуют связным подграфам. При α_0 каждый признак образует отдельный кластер, а при α_m - все признаки объединяются в один кластер.

Для выделения связных подграфов для каждого порога кластеризации используем метод систематического перебора всех вершин – поиск в ширину (ПВШ).

Метод был апробирован на модельных данных: наборы исследуемых признаков имели нормальное распределение с заданной матрицей коэффициентов парной корреляции. Метод применяется к выявлению групп зависимых параметров, характеризующих иммунную систему у больных с заболеваниями доброкачественными (фиброаденомы) и злокачественными (РМЖ) опухолями молочной железы. Совместно с параметрами иммунной системы рассматривалась система ферментов, действие которых направлено на поддержание баланса между окислением и восстановлением липидов клеточных мембран. Выявленная структура связей не противоречит известным фактам.

Литература

1. Федорова О.П., Федорова П.Л. Метод определения групп зависимых величин // Вестник Томского университета. Бюллетень оперативной научной информации.-№ 10, 2003- с. 63-69.

Пакет программ CISSEARCH по поиску регуляторных фрагментов в ДНК.

Тараскина Анна Сергеевна¹, Коновалова Татьяна Геннадиевна², Валеев Тагир Фаридович³, Штокало Дмитрий Николаевич¹, Черемушкин Евгений Сергеевич³

1 Студент, Новосибирский Государственный Университет

2 Аспирант, Институт Цитологии и Генетики, Новосибирск

3 Аспирант, Институт Систем Информатики, Новосибирск

Институт Систем Информатики им. А. П. Ершова СО РАН, Новосибирск, Россия

E-mail: anna@biorainbow.com

Целью работы является создание пакета программ, состоящего из набора средств по анализу последовательностей ДНК и распознаванию цис-элементов (специфических участков ДНК). Эти данные позволяют решать широкий спектр задач анализа генома и разработки лекарственных препаратов[1].

В пакете программ реализованы несколько методов, учитывающих различные биологические особенности (эволюцию промоторов, композиционную регуляцию, влияние контекста, профили экспрессии, пути передачи сигнала) и позволяющих наиболее полно использовать данные, имеющиеся у экспериментатора.

Пакет CISSEARCH разработанный нашей группой², написан на C++ и на данный момент представляет приложение с графическим интерфейсом позволяющий обрабатывать различные типы данных: последовательности ДНК, гомологи, данные микрочиповых экспериментов, пути передачи сигналов.

Для анализа указанных данных используется пять алгоритмов: обработка микрочиповых данных, анализ набора генов, филогенетический футпринт, анализ единичных полиморфизмов и анализ аллелей.

Результатом работы алгоритмов являются набор предсказанных факторов с весами, а также графическая интерпретация, которая помогает исследователю заранее проверить адекватность исходных данных и оценить полученные результаты качественно.

Нами проведена оценка качества распознавания программной системы на двух экспериментальных примерах. Первый пример – это исследования специальной линии раковых клеток человека, подавляемых фактором E2F-1[2]. Второй – обширный набор

² Проект поддержан фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе СТАРТ

данных пациентов с синдромом хронической усталости, включающих микрочипы, од- нонуклеотидные полиморфизмы, фенотипические данные, соответствующие анализу крови[3]. В результате проведения анализа данных, были выявлены как раз те транс- крипционные факторы, которые, как подтверждено экспериментально, отвечают за ре- гуляцию генов в данном эксперименте.

Проект ориентирован на широкого пользователя и позволяет биологу, незнакомо- му с программированием, обрабатывать свои данные, а также предоставляет набор биб- лиотек для разработчиков, который смогут использовать биоинформатические отделы биотехнологических фирм. Уникальность продукта состоит в его комплексном подходе к решаемой экспериментатором задаче.

Литература

- 1 Cheremushkin E. S., Konovalova T. G., Murzin F. A., Kel A. E. A system of recognition of cis-elements on DNA sequences. // Software tools and mathematical foundations of infor- matics. - Novosibirsk, 2004. - p. 255-269.
- 2 Azemat Jamshidi-Parsiana, Yanbin Donga, Xinyu Zhenga, Heshan Sam Zhoua, Wolfgang Zachariasb, Kelly M. McMasters. Gene expression profiling of E2F-1-induced apoptosis. Gene – 2005 – vol.344 – p.67-77.
- 3 <http://www.camda.duke.edu/camda06/datasets/>

Сравнительный анализ молекул растворителя в PDB структурах

Аксянов Евгений Алексеевич

аспирант

Биологический факультет МГУ, Москва, Россия

evaksianov@belozersky.msu.ru

Водородные связи, опосредованные молекулами воды, играют важную роль во взаимодействии белков с ДНК (Karyagina et al, 2005), а также в стабилизации белковых олигомеров и комплексов белков с низкомолекулярными лигандами. Нами был разрабо- тан алгоритм определения структурных молекул воды на основе сравнительного анализа родственных структур.

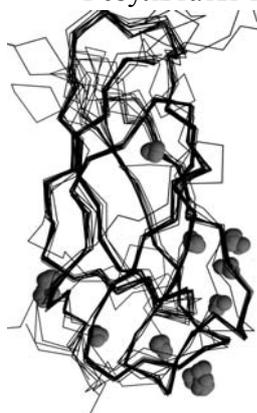
Методы

Определения. Две молекулы воды из родственных структур считаются идентичны- ми, если при пространственном совмещении этих структур расстояние между данными молекулами меньше порога (типичное значение – 1,5 Å). Структурная молекула воды (SWM – structural water molecule) может быть идентифицирована, как идентичные моле- кулы воды, встречающихся в большом количестве структур. *Алгоритм.* На вход алго- ритма поступают совмещенные в пространстве родственные структуры. Задача алго- ритма – найти все имеющиеся в структуре SWM. Алгоритм строит граф, вершины которого соответствуют молекулам воды. Пары вершин, соответствующие идентичным молеку- лам, соединяются ребром. В построенном графе каждая клика соответствует некоторой SWM. Задача состоит в нахождении всех клик, размер которых больше установленного порога. Алгоритм был реализован в программе **wLake**, которая доступна по адресу <http://monkey.belozersky.msu.ru/~evgeniy/wLake/wLake.html>.

Результаты и обсуждение

Результаты программы **wLake** хорошо согласуются с данными, ранее полученны- ми для гомеодоменов. В работе (Karyagina et al, 2005) было обнару- жено 8 структурных молекул воды. Все они также были найдены и программой **wLake**.

В качестве другого примера рассмотрены С-концевые домены NFκB-подобных факторов транскрипции. С помощью программы **wLake** было обнаружено 13 структурных молекул воды (см. рису- нок).



SWM были обнаружены в большом количестве белков и комплексов белков с ДНК. Мы полагаем, что такие молекулы соответствуют молекулам, иммобилизованным на поверхности белка в растворе.

Вклад SWM в образование комплексов белков с низкомолекулярными лигандами, ДНК и другими белками важно учитывать в исследованиях, направленных на изучения белок-белкового и ДНК-белкового распознавания.

Литература

1 Karyagina, A., Ershova, A., Spirin, S. and Alexeevski, A. (2005). The role of water in homeodomain-DNA interaction. // Kolchanov, N. and Hofstaedt, R., editors, Bioinformatics of Genome Regulation and Structure II., Springer Science+Business Media. pp. 247-257.

Алгоритм деления множественного выравнивания на вертикальные блоки

Бурков Борис Андреевич

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет Биоинженерии и Биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: thewatcher@belozersky.msu.ru

Множественное выравнивание отражает гомологию выравниваемых белков. Оно представляет собой последовательности этих белков, записанные таким образом, что схожие по какому-либо признаку позиции белков стоят в одних колонках, а если аналога какой-либо аминокислоты у данного белка нет, то в его последовательности на этом месте стоит прочерк. Предполагается, что аминокислотные остатки, стоящие в одной позиции, выполняют сходные функции, примерно одинаково расположены в пространстве и происходят из одного аминокислотного остатка – общего предка этих остатков.

Программы множественного выравнивания восстанавливают структуру схожести-несхожести определенных областей, имея на входе только последовательности белков. При этом мерой качества выравнивания служит некоторое число — его вес. Результат работы таких программ — множественное выравнивание — может включать участки, соответствующие биологически оправданному выравниванию; участки, где биологически оправданное выравнивание существует, но программа выровняла последовательности неверно; участки, на которых биологически оправданное выравнивание отсутствует.

Мною разработана программа **vblock**, предназначенная для различения «плохих» и «хороших» позиций в заданном множественном выравнивании аминокислотных последовательностей. Программа создана в рамках пакета EMBOSS, версия 2.8.0, на языке C; в ней используется библиотека функций EMBOSS, называемая AJAX.

На выход программа выдает выравнивание с добавленной к нему строкой плюсов и минусов (один символ соответствует одной позиции выравнивания), где плюсы соответствуют правдоподобным позициям, а минусы — выровнявшимся плохо. Кроме того, выдается выравнивание, полученное из исходного заменой всех "плохих" позиций колонками из прочерков. Такое прореженное выравнивание может быть использовано, например, для построения филогенетического дерева, т.к. в нем не принимается во внимание шум, вносимый "плохими" позициями.

Программа применена для 30 выравниваний из Pfam разной толщины, длины и консервативности последовательностей. Анализ результатов показал их хорошее качество. Проводится подбор оптимальных значений параметров программы.

Анализ первичной структуры апоптоз-индуцирующего фактора дрожжей**Лукьянов Михаил Михайлович**

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: loukian@belozersky.msu.ru

Исследование молекулярных механизмов апоптоза дрожжей – актуальное, интенсивно развивающееся, направление биологии [1]. В данной работе методами биоинформатики проведено исследование дрожжевого белка Aif1p, являющегося гомологом одного из ключевых белков апоптоза клетки человека и животных – апоптоз-индуцирующего фактора (apoptosis-inducing factor, AIF) [2].

Получены данные о сходстве аминокислотных последовательностей и эволюционной близости Aif1p и белков семейства AIF.

Aif1p является полноценным гомологом AIF: доменная структура Aif1p соответствует доменной структуре AIF; Aif1p обладает всеми основными элементами первичной структуры, которые есть в AIF. В Aif1p есть участок, сходный с участком AIF человека, участвующим во взаимодействии с белком теплового шока Hsp70.

Aif1p и AIF входят в одно семейство белков, обособленное от гомологичных AIF белков апоптоза и неапоптотических флавопротеинов: Aif1p филогенетически более близок к AIF, чем к другим белкам животных, хотя имеет значимое сходство с гомологами AIF – AMID и AIFL; из всех белков дрожжей AIF наиболее филогенетически близок к Aif1p, хотя имеет значимое сходство с дрожжевой глутатионредуктазой.

При сравнительном анализе Aif1p и других AIF между собой и с другими белками выявлены следующие особенности AIF.

Aif1p, а также и другие белки семейства AIF, в том числе AIF человека, имеют трансмембранный сегмент, что имеет большое значение для выполнения функций AIF в апоптозе.

У белков семейства AIF, в том числе и Aif1p, есть участок, встречающийся у белков, взаимодействующих с актином. На основании полученных данных выдвигается гипотеза о возможности взаимодействия между AIF и актином и влиянии этого взаимодействия на структуру цитоскелета и на проницаемость наружной митохондриальной мембраны при апоптозе.

Один из ДНК-связывающих участков белков семейства AIF, в особенности Aif1p, сходен с участком белка Hmssb, связывающегося с одноцепочечной ДНК. Делается предположение о том, что роль AIF в разрушении ДНК заключается в поддержании её в одноцепочечном состоянии, в котором, как известно, ДНК более эффективно расщепляется нуклеазой EndoG.

С использованием последовательности Aif1p были получены данные эволюционного характера, касающиеся AIF и родственных семейств белков.

Белки *Aspergillus nidulans*, *Schizosacharomycetes pombe* и других грибов, описанные как AIF, на самом деле относятся к AIFL. Aif1p – наиболее близкий гомолог AIF среди всех описанных гомологов AIF в царстве грибов.

Было обнаружено, что два похожих друг на друга гипотетических белка являются гомологами AIF. Они имеют сходство как с Aif1p, так и с AIF человека. Наличие в последовательности этих белков участков, богатых положительно заряженными аминокислотными остатками, позволяет предположить их способность к ядерной локализации и взаимодействию с ДНК.

Литература

1. Ludovico P. et al. Yeast Programmed Cell Death: An Intricate Puzzle. (2005) *IUBMB Life*, 57(3): 129 – 135.
2. Wissing S. et al. An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. (2004) *J Cell Biol*, 166, 7.

Сравнение методов реконструкции филогенетических деревьев**Жемолдинов Диан Надирович,***студент факультета кибернетики МИФИ (ГУ), Москва, Россия;***Спирин Сергей Александрович,***к.ф.-м.н., с.н.с. НИИФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия**armoire@mail.ru*

Целью работы являлась проверка нескольких методов реконструкции филогенетических деревьев из пакета PHYLIP (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Проверка проводилась на выборке из 286 выравниваний аминокислотных последовательностей из банка COGs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/>). В выборку попали все те выравнивания, которые включали не более 100 последовательностей, представляющих при этом не менее 16 из 19 групп бактерий. Перед реконструкцией филогении из выравниваний были удалены паралоги (согласно информации, представленной в банке данных COGs).

Сравнивались следующие методы: Neighbor-Joining, UPGMA, Fitch, Kitsch, Maximum Likelihood и Maximum Parsimony. Все методы тестировались при значениях параметров, установленных в пакете PHYLIP по умолчанию.

В качестве критерия оценки полученного дерева использовались два показателя. Первый показатель – число филогенетических групп, правильно выделенных на реконструированном дереве. Правильными считались филогенетические группы, имеющиеся в таксономической базе NCBI. Вторым показателем (названный “SavCons”) представляет собой суммарную оценку качества всех веток дерева; качество каждой ветки оценивалось на основании числа позиций выравнивания, консервативных в пределах данной ветки. Преимуществом этого показателя является то, что он не опирается на филогенетическое разбиение выравнивания, а значит, пригоден для оценки деревьев, построенных по любым выравниваниям.

Сравнение методов на исследованной выборке показало, что метод UPGMA заметно лучше других. Немного ему уступает метод Neighbor-Joining. Методы Maximum Likelihood, Fitch и Kitsch показывают примерно одинаковые результаты и заметно уступают лидерам. Наконец, наихудшим является метод Maximum Parsimony.

Результаты, полученные на основании двух независимых показателей (число филогенетических групп и SavCons), хорошо согласуются между собой. Последнее означает, что SavCons может быть применён в качестве показателя для оценки качества реконструкции филогенетического дерева.

В дальнейшем планируется сравнить различные методы реконструкции филогении на других выборках множественных выравниваний (в том числе, выравниваний, содержащих паралоги), а также оценить эффект от использования значений параметров, отличных от установленных по умолчанию.

«Предсказание аминокислотных остатков, определяющих специфичность транспортеров семейства DAACS к транспортируемому веществу»**Решетов Денис Александрович***Студент**Рахманинова Александра Борисовна**Ст.преп, к.б.н.*

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Факультет Биотехнологии и Биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: reshetovdenis@rambler.ru

Мембранные белки составляют важную часть протеомов (от 16 до 26%) [1]. Это особый класс больших гидрофобных молекул, что затрудняет их изучение. В частности недостаточно изучены причины различий в их специфичности.

В нашей группе ранее был создан инструмент (SDPpred [2]) для предсказания аминокислотных остатков (СДП), дискриминирующих специфичность по отношению к субстрату или лиганду у белков одного гомологичного семейства.

Задача настоящей работы – применить данный метод для изучения причин различий в специфичности транспортеров семейства DAACS (Pfam: PF00375).

На основе литературных данных и филогенетического дерева семейства были выделены 5 групп специфичности: бактериальные транспортеры нейтральных аминокислот, бактериальные транспортеры глутамата, бактериальные транспортеры дикарбоновых кислот, эукариотические транспортеры нейтральных аминокислот, эукариотические транспортеры глутамата.

С помощью SDPpred были предсказаны позиции, отвечающие за различие в специфичности указанных групп.

Получены следующие результаты.

- Транспортеры глутамата отличаются от транспортеров нейтральных аминокислот у эукариот по 12 СДП; в транспортерах глутамата в них находятся более гидрофильные остатки, чем в транспортерах нейтральных аминокислот.
- Транспортеры глутамата отличаются от транспортеров нейтральных аминокислот у бактерий по 29 СДП, а транспортеры дикарбоновых кислот по 56. Причем СДП бактериальных транспортеров глутамата, а также транспортеров дикарбоновых кислот содержат большее количество положительно заряженных а.о., чем СДП бактериальных транспортеров нейтральных аминокислот.
- Доля важных, экспериментально охарактеризованных позиций среди СДП в 5-7 раз больше, чем среди всех позиций выравнивания белков данного семейства.
- Наложение СДП на структуру показало, что они находятся на дне обширной чашеобразной выемки структуры транспортера, с внеклеточной стороны.

На основании полученных результатов предлагаются следующие гипотезы:

1. Разделение специфичностей в бактериальных и эукариотических группах происходило независимо, но параллельными путями.

2. В бактериальных транспортерах аминокислотным остатком, отвечающим за распознавание аминокислотной группы, по-видимому, является остаток в позиции, соответствующей 345 GLTP_BACSU. А за дискриминацию отрицательно заряженных субстратов отвечают 265, 303, 335, 337, 352, 370, 371, 377, 381 позиции по GLTP_BACSU.

Литература

1. Rost B., Did evolution leap to create the protein universe? *Curr Opin Struct Biol.* 2002 Jun;12(3):409-16.
2. Kalinina OV, Novichkov PS, Mironov AA, Gelfand MS, Rakhmaninova AB., SDPpred: a tool for prediction of amino acid residues that determine differences in functional specificity of homologous proteins. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W424-8.

Динамика свертывания при дефиците VIII и IX факторов: математическая модель

Платонов Андрей Петрович

Студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, ВМиК

atbfom@mail.ru

При отсутствии повреждения сосудов в организме для того, чтобы кровоток не нарушался, необходимо равновесие между факторами, способствующими свертыванию крови или тормозящими его. При нарушении равновесия возникает либо кровоточи-

вость, либо повышенное тромбообразование. Наиболее часто рассматриваются патологические состояния, связанные с дефицитом VIII (гемофилия А) и IX (гемофилия В) факторов.

При существенных дефицитах VIII и IX факторов возникают серьезные геморрагические нарушения (сопровождающиеся кровотечениями) – гемофилия А и В. Это вызвано недостаточной генерацией тромбина и, следовательно, фибрина. Целью данной работы является математическое моделирование динамики активации факторов свертывания при дефиците VIII и IX факторов.

Предложенная математическая модель основана на схеме биохимических реакций в процессе гемокоагуляции. Важная особенность этой схемы - это активация внешнего пути, запускаемого тканевым фактором (ТФ), и внутреннего пути, в котором участвуют VIII, IX и XI факторы.

Ферментативные реакции, участвующие во внешнем и внутреннем путях, приводят к активации протромбина и, следовательно, к образованию протромбина и формированию тромба.

Особое внимание уделено роли ТФ, являющегося мембранным рецептором эндотелиальных клеток. В зоне повреждения диффузия и конвективный транспорт факторов свертывания и ингибиторов играет не очень большую роль, поэтому для описания динамики процесса применена система обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ). В рамках ОДУ модели объемная концентрация ТФ выражена как средняя поверхностная концентрация в единице объема.

Математическая модель соответствует системе биохимических реакций. Каждое из нелинейных обычных дифференциальных уравнений выражает закон сохранения массы для одного из участвующих в процессе химических соединений. Принята кинетика Михаэлиса-Ментена. Активированные факторы свертывания ингибируются путем образования комплексов (реакции второго порядка), кроме действия реакции ограниченного протеолиза.

При нормальном функционировании изменение интенсивности свертывания выражено в терминах производства фибрина, производство которого происходит при непосредственном участии тромбина. Поэтому для изучения изменения эффективности свертывания исследуется максимальная концентрация тромбина и время, необходимое для ее достижения. Изменение концентрации тромбина со временем при повреждении сосуда определяется численным решением динамической системы при дефицитах различных факторов свертывания.

Полученные результаты указывают на очень низкую чувствительность генерации тромбина к значительным дефицитам VIII и IX факторов свертывания.

Исследование методом математического моделирования динамики свертывания крови при дефицитах VIII и IX факторов позволило установить особенности процессов, которые не были ранее обнаружены с помощью биохимических методов. Открытие необычной динамики фактора Va открывает перспективу создания нового метода лечения, основанного на использовании высоких концентраций фактора Va для увелечения генерации тромбоцитов.

Литература:

- 1 Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Биология: В 3-х т. Т.2: Пер. с англ./Под ред. Р.Сопера.- 2-е изд.- М.: Мир, 1996.
- 2 Физиология человека/Под ред. Р.Шмидта и Г.Тевса: В 3-х т. Т.2: Пер. с англ./Под ред. акад. П.Г.Костюка.- 2-е изд.- М.: Мир, 1996.
- 3 Willems G, Lindhout T, Hermens W, Hemker H. Simulation model for thrombin generation in plasma. Haemostasis. 1991; 21: 197-207
- 4 Mann K. Biochemistry and physiology of blood coagulation. Thromb Haemost. 1999; 82: 165-174

- 5 Khanin M.A., Semenov V.V. A mathematical model of the kinetics of blood coagulation. J Theor Biol. 1989; 136: 127-134
- 6 Cawfthorn K.M., van't Veer C., Lock J.B., DiLorenzo M.E., Branda R.F., Mann K.G. Blood coagulation in Hemophilia A and Hemophilia C. Blood. 1998; 91: 4581-4592.

ПРОГРАММА ИЗВЛЕЧЕНИЯ СИМВОЛЬНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРОМОТЕРОВ ГЕНОВ “PROMEXTRA”

Штокало Д.Н.

студент

Новосибирский Государственный Университет, ММФ, Новосибирск, Россия

E-mail: dmitry@biorainbow.com

В современной биоинформатике символьное представление промоторов генов (участков ДНК, отвечающих за активность генов) является чрезвычайно важным объектом анализа, исследование которого расширяет понимание процессов регуляции функционирования генов [1]. Целью работы явилось создание приложения, способного быстро и качественно предоставлять символьные последовательности промоторов генов, используя идентификаторы генов, вводимые пользователем. Была включена обработка идентификаторов генов наиболее известных генетических баз данных.

Программа написана в среде Microsoft Visual Studio с использованием библиотеки MFC и представляет собой многооконное приложение. Имеется два типа окон – окна для списка идентификаторов генов и окна для вывода символьной последовательности промоторов (последовательности в четырёхбуквенном алфавите a,c,g,t – нуклеотидов).

Процесс извлечения промоторов в рамках программы делится на три этапа. На первом этапе пользователь загружает либо составляет список идентификаторов генов, символьную последовательность промоторов которых он желает получить. На втором этапе пользователь отмечает пространства имён, к которым принадлежат введённые им идентификаторы генов, а так же выбирает желаемую длину промотора от 1100 до 60 пар нуклеотидов. В последней версии программы пользователь имеет возможность осуществлять поиск в пространстве имён семнадцати генетических баз данных: Affimetrix, EMBL, HUGO, RefSeq_peptide, SWISSPROT, EntrezGene, UniGene, GO и др. На третьем этапе программа осуществляет поиск по внутренним таблицам и составляет список промоторов в формате EMBL (формат вывода подпоследовательности ДНК).

Рассмотрим третий этап, заключающий в себе суть приложения, подробнее. Программа располагает таблицами, определяющими соответствие между различными идентификаторами генов и набором промоторов в формате EMBL. Таблицы получены при помощи специально разработанной утилиты на языке Perl (с использованием модулей BioPerl[2]), извлекающей из базы данных Ensembl[3] всевозможные идентификаторы генов и подпоследовательности ДНК размером 1100 пар нуклеотидов, находящиеся в непосредственной близости к гену. Считается, что эти подпоследовательности и являются промоторами. В таблицах хранится более 30 тыс. промоторов и около 430 тыс. различных идентификаторов известных генов. В рабочем виде программа занимает около 62 мегабайт. Ввиду того, что записи таблицы отсортированы и проиндексированы, поиск и вывод результата занимает от несколько секунд до нескольких минут. Генетическая база данных Ensembl находятся в процессе постоянного дополнения и изменения, поэтому рекомендуется периодически обновлять таблицы программы при помощи сопутствующей утилиты для поддержки актуальности выдаваемого программой материала.

Готовая свободно распространяемая версия программы PromExtra находится на сайте www.biorainbow.com.

ПОДСЕКЦИЯ «МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ»

Моделирование открытия канала никотинового ацетилхолинового рецептора

Ли Аньбан (КНР)

биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

E-mail: anbang@moldyn.org

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR) относится к семейству лиганд-зависимых ионных каналов, состоящих в основном из пяти субъединиц. Трёхмерная структура трансмембранного домена рецептора из электрического органа Torpedo была определена с разрешением 4\AA ^[1]. Для выяснения механизма открытия канала nAChR была взята модельная структура, составленная из пяти M2 спиралей, которые стабилизировались углеводородным кольцом $(\text{CH}_2)_{105}$. Для изучения Ван-дер-ваальсовских ограничений на проницаемость канала использовался незаряженный комплекс $\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_6$, состоящий из атома Na и шести молекул H_2O , общим диаметром - 7.27\AA , который помещался по центру с внеклеточной стороны канала nAChR. Проведенные расчёты методом управляемой молекулярной динамики (использовался пакет ПУМА и следующие параметры: потенциальное поле AMBER 99, периодические граничные условия, столкновительный термостат, $T=300\text{K}$, $\epsilon=1$, К сила $F=1\text{ккал/моль}\cdot\text{\AA}$, приложенная к комплексу $\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_6$ вдоль оси нормали мембраны) показали наличие значительных стерических ограничений на проникновение комплекса через канал.

Моделирование процесса открытия канала осуществлялось путем введения момента сил. Причина возникновения момента сил состоит в воздействии внутренних β -изгибов внеклеточного домена на верхние остатки α -M2. Момент прикладывался к атомам СТ остатков α -THR267, α -SER268, α -SER269 и α -ALA270 (цепей A и D), которые находятся на верхнем конце α -M2 спиралей. Момент прикладывался по часовой стрелке после релаксации системы. В этом случае, при движении $\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_6$ в канале происходило сначала торможение в области с координатой $z\approx 86\text{\AA}$, а затем сквозное прохождение через полость канала. Структура изучаемого трансмембранного домена при этом испытывает конформационный переход в состояние суперспирали. В контрольных вычислительных экспериментах (без приложенного момента, или с моментом, направленным в противоположную сторону), комплекс $\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_6$ застревал в канале, в области $z\approx 86\text{\AA}$. Результаты исследования показывают, что: 1) остатки 13' -- α A-VAL255, β B-VAL261, δ C-VAL269, α D-VAL255 и γ E-ILE264, которые находятся в области канала с координатой $z\approx 82\text{\AA}$, образуют ворота канала; 2) ворота открываются при переходе канала в суперспираль за счет приложенного по часовой стрелке момента сил к остаткам M2, ближайшим к внеклеточной области. Таким образом, подтверждается гипотеза о том, что внеклеточный домен испытывает конформационные изменения после связывания лиганда, которые передаются в виде момента сил на верхние остатки M2 субъединиц A и D, вызывая открытие канала^[2]. Возможно, механизм перехода в суперспираль является достаточно универсальным для открытия лиганд-зависимых ионных каналов.

Работа выполнена на кафедре биоинженерии (научный руководитель профессор К.В. Шайтан) при финансовой поддержке РФФИ (грант 04-04-49645) и Роснауки.

Литература:

- 1 Miyazawa, A., Y. Fujiyoshi, and N. Unwin. "Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore" // Nature (2003), 423, 949-955
- 2 Unwin N. "Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution" // J.Mol.Biol (2005), 346(4), 967-989

Исследование кинетического механизма взаимодействия кофермента с транскетолазой**Оспанов Руслан Ваитович**

аспирант

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия**E-mail: ospanov@mail.genebee.msu.ru*

Одним из ключевых ферментов пентозофосфатного пути превращения углеводов является транскетолаза (ТК). ТК катализирует обратимый перенос двууглеродного фрагмента с субстрата донора на субстрат акцептор. Транскетолаза представляет собой димер, содержащий два активных центра, функционально эквивалентных по связыванию кофактора – тиаминдифосфата (ТДФ). В спектре поглощения при связывании ТДФ с дрожжевой апотранскетолазой появляется полоса с максимумом при 320 нм, интенсивность которой пропорциональна доле образовавшегося каталитически активного холофермента. Связывание ТДФ с апоТК происходит в две стадии – образование легко диссоциирующего, каталитически неактивного комплекса ТДФ·ТК и каталитически активного комплекса ТДФ*-ТК. Кочетовым и сотр. была предложена схема двустадийного связывания ТДФ с димерной молекулой фермента, учитывающая взаимодействия ТДФ-связывающих центров в молекуле фермента. В настоящей работе получены строгие математические выражения, описывающие кривые спектрофотометрического титрования апоТК тиаминдифосфатом в рамках предложенной схемы, и рассчитаны равновесные константы связывания ТДФ с апоТК в присутствии Ca^{2+} и Mg^{2+} . Были составлены дифференциальные уравнения, описывающие кинетический механизм взаимодействия ТДФ с апоТК и определены константы скорости прямой и обратной реакции для каждого активного центра. Проанализированы взаимодействия между активными центрами транскетолазы для каждого типа ионов. Исследование эффектов кооперативных взаимодействий проводили построением графиков зависимости нормированной доли конформационно измененных состояний молекулы транскетолазы от степени насыщения белка тиаминдифосфатом. Кооперативные взаимодействия на этом графике характеризовались тем, как проходит кривая, выше или ниже прямой линии, проходящей под углом 45° . Отрицательной кооперативности соответствовали кривые, проходящие выше этой прямой, положительной - ниже этой прямой. Показано, что как в присутствии ионов магния, так и в присутствии ионов кальция наблюдается отрицательная кооперативность, причем во втором случае она выражена в большей степени. Причиной отрицательной кооперативности является различие в значениях констант скорости обратного конформационного перехода в активных центрах фермента.

Исследование сигнальных пептидов белка NS2 вируса гепатита С с помощью метода молекулярной динамики**Оршанский И.А.**

Студент 5 курса

*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, Россия.**Ingar@moldyn.org*

Вирус гепатита С (Hepatitis C virus или HCV) представляет собой мелкий сферический вирус, имеющий белково-липидную оболочку и РНК положительной полярности, длиной около 9,5 kb. Вирус имеет 30-60 нм в диаметре, принадлежит к семейству Flaviridae, роду Heparacivirus.

Геном ВГС содержит длинную открытую рамку считывания, фланкированную 5' и 3' нетранслируемыми областями, и кодирует полипротеин-предшественник длиной от 3010 до 3033 аминокислот, который расщепляется сигнальной пептидазой хозяина и двумя другими пептидазами, кодируемыми вирусом, на, по крайней мере, 10 вирусных

белков: С, Е1, Е2, р7, NS2, NS3, NS4А, NS4В, NS5А, и NS5В. Последние белки в ряду перечисленных обуславливают развитие болезни, начиная с клеточного уровня.

Таким образом, для функционирования вируса важно, чтобы полипротеин-предшественник был разделён на составляющие части. Первой пептидазой вируса, начинающей расщепление полипротеина после того, как пептидаза хозяина отщепила все возможные фрагменты, является NS2 -NS3 белок. Он обладает автокаталитической металлопротеазной активностью, которая расщепляет его на белки NS2 и NS3.

NS2 – трансмембранный белок длиной в 217 ак (810-1026), содержащий две сигнальные последовательности: 839-883 ак и 928-960 ак. Наличие двух сигнальных последовательностей указывает на то, что у белка имеется несколько трансмембранных доменов. Было показано, что для эффективного расщепления необходима локализация NS2-NS3 на поверхности мембран ЭПР. Таким образом, предотвратив благополучное встраивание NS2 в мембрану, обусловленное существованием двух сигнальных последовательностей, можно предотвратить развитие вирусной инфекции.

В процессе исследования было показано, что для обеих сигнальных последовательностей характерна α -спиральная конформация. По результатам исследования термостабильности методом молекулярной динамики удалось выделить два стабильных α -спиральных участка, разделенных остатком лейцина. В первом же сигнальном пептиде структура была гораздо менее однородная: в нем четко выделялись три α -спирали, разделенных довольно протяженными участками нерегулярной структуры.

Один из описанных механизмов встраивания сигнального пептида подразумевает у него наличие структуры, показанной для второго сигнального пептида: две α -спирали, разделенные нерегулярным участком. Как показали дальнейшие эксперименты по внедрению пептида в мембрану, проводимые с использованием метода управляемой молекулярной динамики, проникновение в мембрану второго пептида происходило за меньшее время при той же приложенной работе.

В работе рассматриваются также: динамическое поведение сигнальных последовательностей в неполярной и полярной средах, при переходе их одной среды в другую; перемещение пептидов через липидный бислой под действием внешних сил.

Научный руководитель работы профессор К.В. Шайтан. Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 04-04-49645) и Роснауки.

Изучение взаимодействия трегалозы с фосфолипидным бислоем в условиях обезвоживания методом молекулярной динамики

Фомичёв Руслан Николаевич

Студент четвёртого курса

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: ademantine@mail.ru

Некоторые живые организмы проявляют способность к выживанию в условиях глубокого обезвоживания. В работах по изучению механизмов устойчивости к обезвоживанию центральным объектом является липидная мембрана. При выявлении возможного механизма мембранной защиты была выдвинута гипотеза о замене молекул воды из гидратной оболочки мембраны молекулами олигосахаридов, которые образуют водородные связи с полярными головками фосфолипидов. Как результат этой замены, площадь, занимаемая одним липидом (area per lipid, APL) не увеличивается при обезвоживании, при этом мембрана остаётся в жидко-кристаллическом состоянии и не разрушается. Методы молекулярного моделирования, такие, как молекулярная динамика (МД), открывают широкие возможности для изучения взаимодействия олигосахаридов и других защитных агентов с обезвоженной мембраной на атомарном уровне.

Первым шагом нашей работы явилась самосборка в структуру бислоя произвольной системы, состоящей из шестидесяти четырёх молекул 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолина (ПОФХ) и трёх тысяч двухсот молекул воды. Площадь, занимаемая одним липидом, составила $0,66 \text{ нм}^2$. Следующим шагом было создание атомарной модели, наиболее достоверно отображающей механизм обезвоживания бислоя. Нами были созданы и протестированы четыре модели. В первой модели вода удалялась из окружения бислоя при постоянном атмосферном давлении. В ходе тестирования этой модели с применением периодических граничных условий было обнаружено, что при малом количестве воды бислой образует мультислабую структуру. Во второй модели вода удалялась без изменения объёма системы, что препятствовало образованию мультислабых структур. В третьей и четвёртой моделях молекулы воды были заменены на атомы аргона и на ионы соли (Na^+ и Cl^-) соответственно. Такое замещение предотвращало образование мультислабых структур. Для каждой модели был проведён ряд симуляций МД бислоя, находящегося в различных степенях обезвоживания: соотношение липид/вода составило 1/5.4, 1/11.7, 1/15.8, 1/22.5 и 1/28. Длина каждой траектории составила 20 нс.

В результате тестирования было найдено, что вторая, или “вакуумная” (как она была названа в дальнейшем), модель наиболее точно отображает механизм обезвоживания. APL (площадь, занимаемая одним липидом) для этой модели практически совпадает с экспериментальными данными (0.49 нм^2 при наименьшей степени обезвоживания). Дальнейшее изучение влияния олигосахарида трегалозы на структуру обезвоженного бислоя происходило с использованием этой модели. В результате ряда симуляций МД бислоя в низких степенях обезвоживания при различных количествах молекул трегалозы было показано, что APL практически достигает значения для полностью гидратированного бислоя.

Использованная литература

- 1 S. W. Chiu et al. Combined Monte Carlo and Molecular Dynamics Simulation of Fully Hydrated Dioleoyl and Palmitoyl-oleoyl Phosphatidylcholine Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, volume 77, november 1999.
- 2 Amadeu K. Sum et al. Molecular Simulation Study of Phospholipid Bilayers and Insights of the Interactions with Disaccharides. *Biophysical Journal*, volume 85, november 2003.
- 3 Sagar A. Pandit et al. Molecular Dynamics Simulation of a Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer with NaCl. *Biophysical Journal*, volume 84, june 2003

Молекулярное моделирование механизма связывания субстрата в активном центре пенициллинацилазы

Новиков Ф.Н., Строганов О.В., Халиллуин И.Г., Чиров Г.Г.

Студент 5 курса.

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

E-mail: novikov@belozersky.msu.ru

Предыдущие исследования пенициллин G ацилазы (PGA) из *E.coli* подняли спорный вопрос о роли двух остатков активного центра — aR145 и bR263 в связывании отрицательно заряженных субстратов. Участие положительного заряженного остатка в связывании субстрата PGA было оценено в текущем исследовании *in silico*: положительный заряд аргинина был исключен (aR145L мутацией), а отрицательный заряд субстрата был удален путем использования метилового эфира (PGM).

В качестве модельных систем были выбраны нативный фермент (пенициллин G ацилаза из *E.coli*) и его мутант aR145L, а в качестве субстратов — бензилпенициллин (PGA) и его метиловый эфир (PGM). Был исследован начальный этап образования фермент-субстратного комплекса. Помимо связывания фермента в активном центре фермента были обнаружены несколько других фермент-субстратных комплексов; один из них, по-

видимому, предшествует продуктивному связыванию (предпродуктивный комплекс), а другой препятствует продуктивному связыванию субстрата (непродуктивный комплекс).

Было показано существование различий в связывании субстрата в открытой и закрытой конформации фермента. При продуктивном связывании различия обусловлены смещением остатка aF146, который прижимает субстрат в оксианионный центр. Из-за смещения aF146 происходит частичный выход пенициллина из активного центра и ухудшение предреакционной статистики. При непродуктивном и предпродуктивном связывании переходы между открытой и закрытой конформациями фермента могут приводить к исчезновению или возникновению тех или иных центров связывания субстрата.

Были рассчитаны траектории продуктивных, предпродуктивных и непродуктивных комплексов в открытой и закрытой конформациях для каждой из четырех модельных систем (всего 24 траектории) длиной от 5 до 15 нс.

В результате анализа траекторий был предложен механизм проникновения субстрата в гидрофобный карман фермента, и объяснена роль остатков aR145, bR263 и bN388 в этом процессе. Также была выяснена роль открытой и закрытой конформации пенициллинацилазы в процессе связывания субстрата и предложена полная кинетическая схема первого этапа ферментативной реакции.

По результатам расчетов свободной энергии и кинетической схеме, были вычислены константы Михаэлиса для каждой из четырех модельных систем. Полученные результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными. Аналогичным образом, используя предреакционную статистику, были оценены каталитические константы.

Моделирование ранних этапов фолдинга флуоресцентных белков методом молекулярной динамики

Ивлиев Александр Евгеньевич, Киселев Георгий Георгиевич

Студенты

Факультета Биоинженерии и Биоинформатики Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

siniy@belozersky.msu.ru

Обсуждение механизма сворачивания белков началось сразу же после расшифровки их первых трехмерных структур и открытия явления самоорганизации. По-видимому, первой появилась гипотеза Филлипса, согласно которой на N-конце растущей цепи белка (с которого начинается его биосинтез) возникает зародыш структуры, а остальная цепь наматывается на него. В поисках пути к решению проблемы самоорганизации белков, О.Б.Птицын в 1973 году предложил концепцию стадийного сворачивания белка. Эта концепция позже получила название "framework model": "каркасная модель". Модель постулировала последовательное вовлечение различных взаимодействий в процесс формирования структуры белка и подчеркивала важность образования зародышевых элементов вторичной структуры на ранних стадиях сворачивания, слипания этих зародышей в расплавленную глобулу, грубо напоминающую нативную конформацию, и затем окончательную "доводку" строения глобулы на последнем этапе самоорганизации.

Флуоресцентные белки хорошо подходят в качестве модели исследования фолдинга, во-первых, потому что это однодоменные растворимые глобулярные белки с жесткой, сравнительно регулярной структурой - β -бочонком, состоящим из 4-х β -листов, разделённых α -спиральными участками. Во-вторых, потому что динамику денатурации и ренатурации флуоресцентных белков легко отслеживать экспериментально по изменению интенсивности их флуоресценции.

В данной работе был проведен ряд компьютерных симуляций поведения структуры полностью денатурированного N-концевого β -листа GFP (зелёного флуоресцентного белка из *Aequorea Victoria*, *Hydrozoa*) и DsRed (красного флуоресцентного белка из *Discosoma striata*, *Anthozoa*) методом молекулярной динамики с целью проверки некото-

рых предположений о роли консервативных глицинов в фолдинге флуоресцентных белков. Максимальная продолжительность симуляций – 20 нс. В результате, на конкретном примере флуоресцентных белков смоделировано образование зародышевых β -листов, продемонстрирована необходимость наличия глицинов в определённых участках цепи, обеспечивающих её подвижность на некоторых этапах формирования зародышевых β -листов, и выявлена также важная роль электростатических взаимодействий, сближающих соседние тяжи при формировании β -листа.

Использование нанотрубок для селективной абсорбции и направленной доставки биологически активных веществ

Турлей Егор Владимирович

аспирант

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: yegor@moldyn.org

В работе разрабатываются методы молекулярного моделирования и молекулярного дизайна комплексов углеродных нанотрубок с биополимерами. Эти объекты являются новым полем для применения методов молекулярного дизайна с использованием неравновесной молекулярной динамики и перспективны для биомедицинских приложений. Ранее рассматривался, в частности, процесс спонтанного встраивания модельной нанотрубки в фосфолипидный бислой в приближения coarse-grain (т.е. крупных, не атомных, блоков) (Lopez et al., 2004). Однако до сих пор практически нет публикаций по динамике взаимодействия биомембран с углеродными нанотрубками в полноатомном приближении. Данная работа является продолжением исследований (Шайтан и др., 2005; Shaitan et al. 2006).

Согласно имеющимся данным, углеродные нанотрубки могут быть использованы в качестве нейтральных (неиммуногенных) емкостей для биологически активных молекул, а также для их селективной доставки к клеточной мембране. Для дизайна таких структур использовался метод управляемой молекулярной динамики (SMD) и силовое поле Amber99. Углеродная нанотрубка (13,5 Å в диаметре, 35 Å в длину, тип укладки атомов – кресло) под действием внешнего давления проникла через поверхность раздела биомембрана-вода. Обсуждаются различные режимы проникновения в зависимости от способа приложения силы к нанотрубке (ко всем атомам равномерно, только к голове, только к хвосту). Обсуждается также механизм проникновения вещества, заключенного в нанотрубке, в клетку с использованием наношприца – выталкивающей силы за счет наповзрыва (Шайтан и др., 2005; Shaitan et al. 2006). Демонстрируется возможность самосборки наноустройств типа наношприца. Обсуждаются вопросы селективности по отношению к абсорбции полостью нанотрубки активных молекул и проблема селективной очистки, например, биологических жидкостей от молекул (типа холестерина). Изучение абсорбции молекул холестерина полостью нанотрубки проводилось при различных условиях в водной среде. Кинетика процесса чувствительна к деталям строения поверхности нанотрубки и функциональным группам молекул, контактирующим с нанотрубкой.

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического ф-та МГУ, научный руководитель работы профессор К.В.Шайтан. Работа поддержана Роснаукой, РФФИ (грант № 04-04-49645), Правительством Москвы и US CRDF.

Литература

- 1 Шайтан К.В., Турлей Е.В., Голик Д.Н., Терешкина К.Б., Левцова О.В., Федик И.В., Шайтан А.К., Кирпичников М.П. (2005) Молекулярная динамика и дизайн био- и наноструктур // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии, 2005, №1(1), p. 66–78.
- 2 Lopez C.F., Nielsen S.O., Moore P.B., Klein M.L. (2004) Understanding nature's design for a nanosyringe // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., №101, p. 4431–4434.

- 3 Shaitan K.V., Tourleigh Ye.V., Golik D.N. (2006) Molecular dynamics of carbon nanotube-polypeptide complexes at the biomembrane-water interface // Carbon Nanotubes: From Basic Research to Nanotechnology, V. Popov and Ph. Lambin (Eds.). NATO Science Series II: Mathematics, Physics and Chemistry, vol. 222, in press.

Молекулярная динамика участка связывания ДНК с актиномицином Д

Левцова Ольга Владимировна

Аспирант 1 года

Московский Государственный Университет им.М.В.Ломоносова,

Биологический факультет

olya@moldyn.org

Актиномицин Д – пептидный антибиотик, препятствующий репликации ДНК у грам-положительных и грам-отрицательных бактерий, а также у некоторых грибов. Молекула актиномицина содержит феноксазоновое кольцо, которое встраивается между гуанин-цитозиновыми парами оснований, а полипептидные петли располагаются вдоль малого желобка, стабилизируя таким образом комплекс ДНК с актиномицином. Актиномицин Д и его производные широко используется в противораковой терапии.

В данной работе изучался участок связывания ДНК с актиномицином Д, состоящий из 8 пар нуклеотидов. Методом молекулярной динамики была изучена динамика и стабильность комплементарной и некомплементарной двуцепочечной ДНК. Некомплементарная спираль была получена заменой всех оснований в одной из цепей комплементарной ДНК, при этом пуриновое основание аденин заменялось на гуанин (и наоборот), а пиримидиновое – цитозин на тимин (и наоборот), чтобы не нарушить геометрические параметры спирали.

С помощью пакета молекулярной динамики Gromacs 3.2.1 в силовом поле Amber99 были посчитаны следующие траектории: ДНК в вязкой среде при температуре 300К, и ДНК в водном окружении при температуре 300К и 500К. Стабильность структур оценивалась с помощью среднеквадратичного отклонения и расстояний между атомами фосфора для каждой пары нуклеотидов. На временах порядка наносекунды при температуре 300К стабильность некомплементарной ДНК лишь незначительно отличается от стабильности комплементарной, а при 500К деградация структуры двойной спирали для некомплементарной ДНК начинается через 200пс.

Также была изучена динамика комплекса актиномицина Д с молекулой ДНК. Данные исследования важны для дальнейшего изучения динамических и энергетических параметров взаимодействия актиномицина Д и его аналогов с молекулой ДНК.

Работа выполнена на кафедре биоинженерии (научный руководитель профессор К.В.Шайтан) при финансовой поддержке РФФИ (грант 04-04-49645) и Роснауки.